

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Dottorato di Ricerca in Biologia Avanzata

(Sistematica molecolare)

XXII ciclo

**EFFETTO DELLA LEPTINA SULLA REGOLAZIONE
DELL'INSORGENZA E DELLA PROGRESSIONE DEI
TUMORI**

Docente tutor:

Prof.ssa Laura Fucci

Docente co-tutor:

Prof. Paolo Laccetti

Coordinatore:

Prof. Luciano Gaudio

Candidata:

Dott.ssa Roberta Fusco

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

Indice

INTRODUZIONE	pag. 4
Omeostasi energetica	pag. 5
L'obesità	pag. 7
La leptina	pag. 8
I recettori della leptina	pag. 12
Le principali vie di trasduzione del segnale attivate dalla leptina	pag. 15
Leptina e cancro	pag. 18
 SCOPO DELLA RICERCA	 pag. 22
 PROCEDURE SPERIMENTALI	 pag. 26
I reagenti	pag. 27
Linee cellulari umane	pag. 27
Culture cellulari	pag. 28
Trattamento con la leptina ed estrazione proteica	pag. 29
Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)	pag. 29
<i>Western blotting</i>	pag. 30
Preparazione del filtro e rivelazione con ECL	pag. 30
Saggio MTT	pag. 31
Saggio di proliferazione cellulare	pag. 32

Saggio di funzionalità di mAb 9F8 <i>in vivo</i>	pag. 32
RNA <i>interference</i>	pag. 33
Selezione dei pazienti	pag. 33
Analisi Immunoistochimica	pag. 34
Analisi statistica	pag. 34
 RISULTATI	 pag. 36
Effetto della leptina sulle linee cellulari	pag. 37
Effetto della leptina sulla vitalità e la proliferazione cellulare	pag. 41
Espressione del recettore LepR	pag. 50
Azione di mAb 9F8 sulle funzioni della leptina	pag. 50
Saggi <i>in vivo</i> del mAb 9F8	pag. 62
L'espressione di LepR correla con la presenza di ER α <i>in vitro</i>	pag. 64
L'espressione di LepR, in pazienti affetti da cancro alla mammella, correla con l'espressione di ER α	pag. 67
 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	 pag. 72
 BIBLIOGRAFIA	 pag. 78

Introduzione

Omeostasi energetica

Il mantenimento del peso corporeo ottimale e la costante disponibilità energetica, sono necessità fondamentali che possono influenzare, significativamente, le probabilità di sopravvivenza di un organismo nel regno animale. Sebbene la massa corporea sia un parametro influenzato da un gran numero di fattori estremamente variabili (Keesey et al., 1997), è stato dimostrato che il peso corporeo nell'uomo è tendenzialmente stabile in età adulta pur tollerando piccole fluttuazioni entro un intervallo molto ristretto (Weigle et al., 1994; Kopelman et al., 2000), tale stabilità è mantenuta grazie ad un efficiente sistema di controllo fisiologico.

Le variazioni del peso corporeo in un organismo adulto, sono principalmente determinate da alterazioni della massa dei tessuti di riserva, ovvero dei depositi energetici, la cui estensione varia in base all'apporto calorico e al dispendio energetico: un aumento del peso dei depositi energetici, equivale quindi ad un incremento della disponibilità energetica dell'organismo (fig.1). Questa condizione si realizza quando l'apporto calorico eccede la quantità di energia consumata ed in questo caso si parla di un bilancio energetico positivo; viceversa un bilancio energetico negativo è caratterizzato da un incremento del consumo energetico che comporta una riduzione del peso dei tessuti di riserva e la conseguente diminuzione della massa corporea. Nei mammiferi, il principale tessuto di riserva è quello adiposo ed il contributo maggiore alla variabilità del peso corporeo proviene, quindi, dalle alterazioni prodotte a carico della massa grassa. La massa del tessuto adiposo rappresenta una misura diretta della quantità di energia disponibile e quindi il mantenimento pressoché costante del volume totale di tessuto adiposo garantisce la stabilità del peso corporeo. Un'alterazione di questo sistema omeostatico, è sufficiente

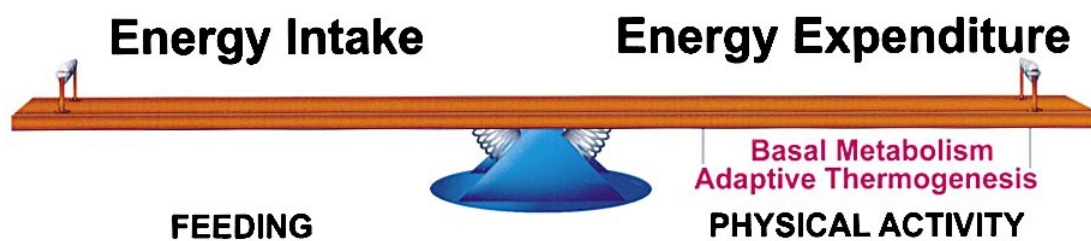


Figura 1: Componenti fondamentali del Sistema di Regolazione Energetico

a determinare uno sbilanciamento dell'equilibrio energetico dell'organismo, alterando il peso corporeo. L'obesità può essere, quindi, considerata come l'effetto di una deregolazione dell'omeostasi energetica.

L'obesità

L'obesità definita clinicamente come un aumento eccessivo del peso corporeo, in particolare del tessuto adiposo, è sufficiente a produrre conseguenze negative per la salute (Kuczmarski et al., 1994). I fattori che determinano l'insorgenza di tale condizione sono molteplici, in particolare si ritiene che l'obesità sia determinata dall'interazione tra fattori genetici, fisiologici e ambientali (Spiegelman et al., 2001). Diversi eventi cellulari possono causare o prevenire l'insorgenza dell'obesità se influenzano la regolazione dell'omeostasi energetica dell'individuo (Spiegelman et al., 2001). Si potrebbe pensare, ad esempio, che l'insorgenza dell'obesità e delle sue complicanze possa essere prevenuta limitando lo sviluppo del tessuto adiposo. Modelli sperimentali murini, nei quali è stata ridotta la differenziazione, lo sviluppo e la sopravvivenza delle cellule adipose, hanno dimostrato che gli animali sembrano soffrire della mancanza di un adeguato deposito per l'energia in eccesso con conseguente perdita di importanti ormoni prodotti dagli adipociti (Moitra et al., 1998). Negli ultimi anni, nei paesi maggiormente sviluppati, è stato osservato un notevole incremento del numero di individui obesi, di diverse età ed estrazione sociale e tale incremento ha indotto gli studiosi a considerare l'obesità come un'epidemia (James, 2004). L'obesità e la sua regolazione sono, da diverso tempo, oggetto di studio anche perchè è stato ampiamente documentato che la sua presenza è associata ad un aumento del rischio di insorgenza di tumori di origine diversa (Carroll, 1998; Bray, 2002; Calle et al., 2004). In particolare l'obesità è considerata, come un notevole fattore di

rischio nell'insorgenza del cancro alla mammella e alle ovaie, nelle donne in post-menopausa (Dennis, 2007) e del cancro alla prostata negli uomini (Baillargeon et al., 2006). I possibili meccanismi attraverso i quali l'obesità può influenzare l'insorgenza del cancro includono la non corretta distribuzione del grasso corporeo e l'alterazione dei sistemi ormonali, inclusi gli ormoni sessuali, e l'insulina. Tuttavia, nonostante la relazione esistente tra obesità e sviluppo di alcuni tumori sia ormai comprovata, i meccanismi patogenici non sono ancora stati chiariti.

La leptina

La leptina, dal graco *leptothos*, magro è un ormone formato da 167 amminoacidi con massa molecolare di 16 kDa (Cohen et al., 1996) codificato dal gene *ob*. Il prodotto di questo gene, localizzato sul cromosoma 6 nel topo e sul cromosoma 7 nell' uomo (Zhang et al., 1994), è stato caratterizzato utilizzando tecniche di mappatura genetica e di "*positional cloning*".

La struttura terziaria della leptina, è caratterizzata da una struttura a doppia elica formata da due coppie di α -eliche antiparallele, unite da due collegamenti lunghi e da un corto *loop*, disposte in una struttura elicoidale (fig.2). Inoltre, è stato dimostrato, che il ponte disolfuro, che coinvolge due residui di cisteina (Cys96 e Cys146) del C-terminale della leptina e la parte iniziale di uno degli anelli, è fondamentale per la formazione della corretta struttura tridimensionale della proteina oltre che per il legame al recettore. La mutazione di uno dei due residui di cisteina rende infatti la proteina biologicamente inattiva (Madej et al., 1995; Frühbeck et al., 1998; Prolo et al., 1998).

Sia la struttura cristallina che l'analisi tramite NMR condotte sulla leptina hanno rivelato che essa presenta sorprendenti somiglianze strutturali con la famiglia delle

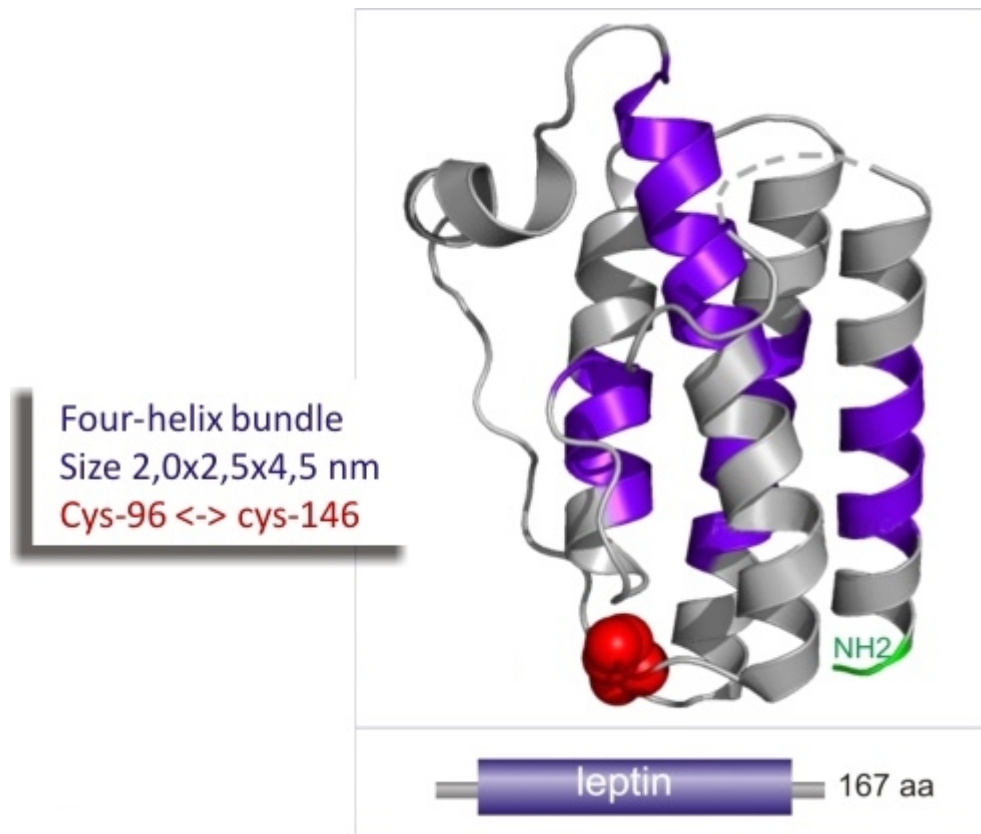


Figura 2: Rappresentazione schematica della struttura della leptina

citochine di classe I a catena lunga, tale struttura si ritrova anche nella somatotropina (GH), nella prolattina (PRL), nell'eritropoietina (EPO) e nell'IL-6 (interleuchina-6), IL-11 e IL-12 (Zhang et al., 1997). Le citochine di classe I sono considerate una famiglia multi genica con le strutture primarie ampiamente variabili. Nell'ambito dei mammiferi, sia la sequenza aminoacidica, che la struttura genica della leptina sono notevolmente conservate (Zhang et al., 1994 ; Masuzaki et al., 1995), con una omologia dell' 80% tra uomo e topo (fig.3). Nell'uomo e nel topo la leptina è secreta prevalentemente dalle cellule adipose, in proporzione alla massa grassa, e svolge il ruolo di segnalare all'ipotalamo la presenza di sufficienti riserve di energia (Banks, 2004; Unger, 2004; Zhang et al., 1994 ; Maffei et al., 1995; Friedman et al., 1998; Ahima et al., 2000). Tuttavia essa è prodotta, in minima parte, anche dalla placenta, dall'epitelio mammario, dalla mucosa gastrica, dal midollo osseo, dal muscolo scheletrico, dall'ipotalamo e dalle ossa (Masuzaki et al., 1997; Bado et al., 1998; Wilkinson et al., 2000). La leptina circola nel plasma come peptide libero o associato ad altre proteine plasmatiche (Horn et al., 1996 ; Houseknecht et al., 1996 ; Lammert et al., 2001) e non è rilevabile nel plasma del mutante obeso *ob/ob* (Halaas et al., 1995). In questi animali, infatti, è stata caratterizzata una transizione non senso al codone 105 del gene *ob*, che causa la produzione di un peptide tronco non funzionante (Zhang et al., 1994). Il fenotipo fortemente obeso del topo *ob/ob*, è dunque la conseguenza dell'incapacità di produrre leptina circolante. Tra i modelli murini di obesità ereditaria, i mutanti *ob/ob* e *db/db*, presentano un fenotipo identico, caratterizzato dallo sviluppo estremamente precoce di una forte obesità. Le disfunzioni metaboliche tipiche di questo modello: sono la costante ricerca di cibo, la sostanziale depressione delle attività motorie spontanee e un grave ritardo dello sviluppo del sistema riproduttivo (Friedman, 1991;

Ravussin, 2002; Unger, 2004). Alcune delle alterazioni fisiologiche e ormonali riscontrate in questi mutanti, sono sovrapponibili a quelle osservate in animali privati del cibo per lunghi periodi sebbene l'apporto calorico sia, al contrario, sproporzionatamente elevato. Studi effettuati sui mutanti *ob/ob* e *db/db*, hanno evidenziato che questi animali vivono spinti da una cronica e costante condizione di fame, che li costringe ad accumulare più energia possibile ad ogni pasto e a ridurre il dispendio energetico per funzioni non vitali.

Le funzioni svolte dalla leptina non si esauriscono a livello ipotalamico e non riguardano esclusivamente il mantenimento dell'omeostasi energetica (Baratta et al., 2002) ma coinvolgono tutto il sistema nervoso centrale e periferico (Frühbeck, 2001; Frühbeck, 2002; Bjørbæk et al., 2004). La leptina, infatti, è coinvolta a vario titolo nell'interferire in numerosi processi fisiologici quali: la regolazione del metabolismo, la crescita, lo sviluppo, la regolazione di alcuni processi endocrinologici ed immunologici, la riproduzione, la fisiopatologia cardiovascolare e il mantenimento della funzione respiratoria (Gainsford et al., 1996; Sierra-Honigmann et al., 1998; La Cava et al., 2004).

Pertanto, la scoperta della leptina, ha ampliato le frontiere della conoscenza non solo nei processi che riguardano la regolazione del metabolismo e dell'omeostasi energetica, ma anche in una sfera più ampia di regolazione di processi molecolari e biochimici nei quali la leptina è coinvolta.

I recettori della leptina

La natura pleiotropica della leptina è evidenziata dalla distribuzione quasi ubiquitaria dei suoi recettori (LepRs). La leptina agisce attraverso l'interazione con il suo recettore trans-membrana, il quale mostra una notevole somiglianza strutturale con i recettori delle citochine di classe I (Tartaglia, 1997), tale classe include i recettori per IL-12, IL-6, IL-11,

oltre a quelli per l'ormone della crescita, per la prolattina e per l'eritropoietina. Membri di questa famiglia hanno caratteristici motivi extracellulari formati da quattro residui di cisteina e un motivo WSXWS (Trp-Ser-xaa-Trp-Ser) (Bazan, 1990). LepR è prodotto in diverse forme varianti, tutte dovute a fenomeni di splicing alternativo. Tali varianti definite LepRa, LepRb, LepRc, LepRd, LepRe e di LepRf (Wang et al., 1998; Löllmann et al., 1997), hanno in comune un dominio extracellulare di oltre 800 amminoacidi ed un dominio transmembrana di 34 amminoacidi mentre il dominio intracellulare è variabile e caratteristico per ciascuna delle isoforme (fig.4). Utilizzando come parametro la lunghezza del dominio intracellulare, le isoforme del recettore possono essere classificate in tre classi: corte (LepRa, LepRc, LepRd e LepRf), lunghe (LepRb) e secrete (LepRe). Oltre a contenere identici domini transmembrana ed extracellulare, le isoforme corte e lunghe condividono i primi 29 amminoacidi del dominio intracellulare, definito box1, tale dominio, ricco in prolina, è necessario per l'interazione e l'attivazione di JAK (Janus Kinase).

L'isoforma lunga LepRb, espressa a livelli elevati nell'ipotalamo, è stata considerata, per lungo tempo, l'unica variante funzionalmente attiva, tale convinzione è evidenziata dalla presenza di un esteso dominio intracellulare di circa 300 amminoacidi (più numerosi nell'uomo che nel topo), contenente vari motivi richiesti per l'interazione con altre proteine e per l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale (box2). Solo recentemente, Cirillo e collaboratori hanno dimostrato che l'isoforma LepRa, pur mancando del dominio citoplasmatico, può attivare una delle possibili vie di trasduzione del segnale in seguito all'interazione con la leptina (Cirillo et al., 2008).

Le isoforme corte, LepRa, LepRc, LepRd e LepRf, sono composte da soli 30-40 residui citoplasmatici. LepRa e LepRc sono altamente espressi nella coroide e nei

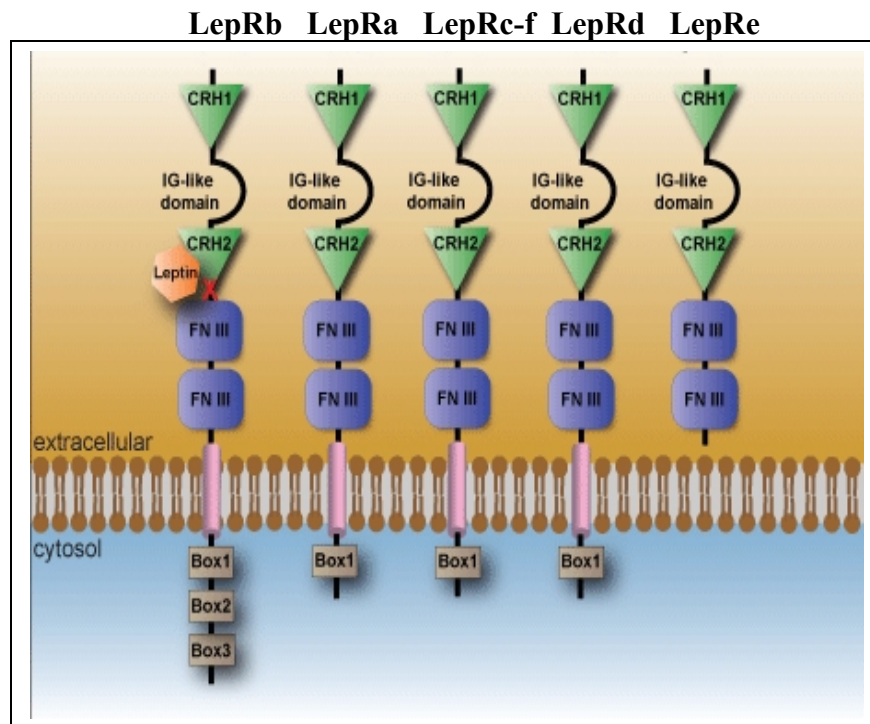


Figura 4: Rappresentazione schematica delle diverse isoforme del recettore LepR.

microvasi, dove essi svolgono un ruolo importante nella captazione della leptina e nel suo trasporto attraverso la barriera emato-encefalica (Hileman et al., 2002). LepRe, a cui manca il dominio intracellulare, è considerata l'isoforma secreta, ed in topo, viene prodotta ad un livello sufficientemente elevato tale da agire come coadiuvante nel trasporto della leptina libera circolante (Löllmann et al., 1997).

Le principali vie di trasduzione del segnale attivate dalla leptina

Nel corso degli ultimi anni, lo studio degli eventi di trasduzione del segnale, derivanti dal legame tra la leptina e il suo recettore, ha portato ad una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari e biochimici che regolano l'azione della leptina. L'omologia dei LepRs con i recettori per tutte le interleuchine riportate precedentemente, ha suggerito la possibilità che il legame recettore-leptina potesse mediare l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale attivate dai recettori per le citochine, tra cui l'attivazione dell'asse JAKs/STATs (trasduttori di segnale e attivatori della trascrizione) e delle MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Baumann et al., 1996; White et al., 1999). La via di trasduzione JAK/STAT è stata identificata come una delle principali vie di segnalazione attivate dalla leptina (Sahu, 2004; Hegyi et al., 2004; Sweeny, 2002; Ahima, 2004). Studi successivi hanno dimostrato che solo l'isoforma lunga, LepRb, contiene i motivi intracellulari richiesti per l'attivazione del sistema JAK/STAT (Bjørnbæk et al., 1997). Eterodimeri chimerici dei recettori di LepRa e LepRb non sono in grado di attivare la via JAK / STAT (Bahrenberg et al., 2002). La via di trasduzione JAK / STAT comprende quattro tirosine chinasi (JAKs) e sette fattori di trascrizione (STATs) i quali sono regolati dalla fosforilazione in specifici residui di serina e tirosina. In genere, la via JAK / STAT è attivata dagli interferoni, dalle interleuchine o da altre citochine i cui

recettori mancano di attività chinasi intrinseca. I recettori LepRs non hanno un dominio con attività tirosin chinasi intrinseca, e quindi legano una chinasi citoplasmatica, JAK2 (Ghiraldi et al., 1997). I domini di legame box1 e box2 hanno la capacità di reclutare e legare le chinasi JAK. La porzione intracellulare di tutte le isoforme di LepR contiene il dominio di legame a JAK, box1, ma solo LepRb presenta anche il motivo box2 e quindi i siti di legame per STAT. In assenza del legame tra la leptina ed il suo recettore, quest'ultimo si presenta come un omodimero non funzionale, la formazione di un dimero, in seguito all'interazione con la leptina, è quindi fondamentale per l'attivazione delle diverse vie di trasduzione del segnale (Devos et al., 1997). Quando la leptina interagisce con LepR, essa causa un cambiamento conformazionale del recettore che espone il dominio di legame per la tirosinchinasi JAK2; LepRb quindi recluta JAK2 che media le fosforilazioni successive. JAK2 attivato si autofosforila e fosforila il recettore su due residui tirosinici essenziali: Y985 e Y1138. Alla tirosina fosforilata in posizione 1138 si lega STAT3 che è fosforilato da JAK2. STAT3, una volta fosforilato, dimerizza, trasloca nel nucleo e va ad attivare l'espressione di numerosi geni tra cui c-fos.

Alla tirosina fosforilata in posizione 985 si lega la tirosin fosfatasi SHP2 che è fosforilata da JAK2 e che forma un sito d'interazione per la proteina adattatrice Grb2, il dimero SHP2-GBR2 va ad attivare la via di segnale delle MAP chinasi attraverso l'attivazione di Ras. In particolare il dimero SHP2-Grb2 determina l'attivazione dalla proteina Ras che a sua volta attiva Raf. Raf è una serina-treonina proteina chinasi che fosforila e attiva MEK, un'altra serina-treonina chinasi, che a sua volta fosforila e attiva ERK che traslocando nel nucleo attiva numerosi geni fra cui c-fos (Bjorbaek et al., 2001) (fig.5). SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling Proteins) lega JAK2 e inibisce la

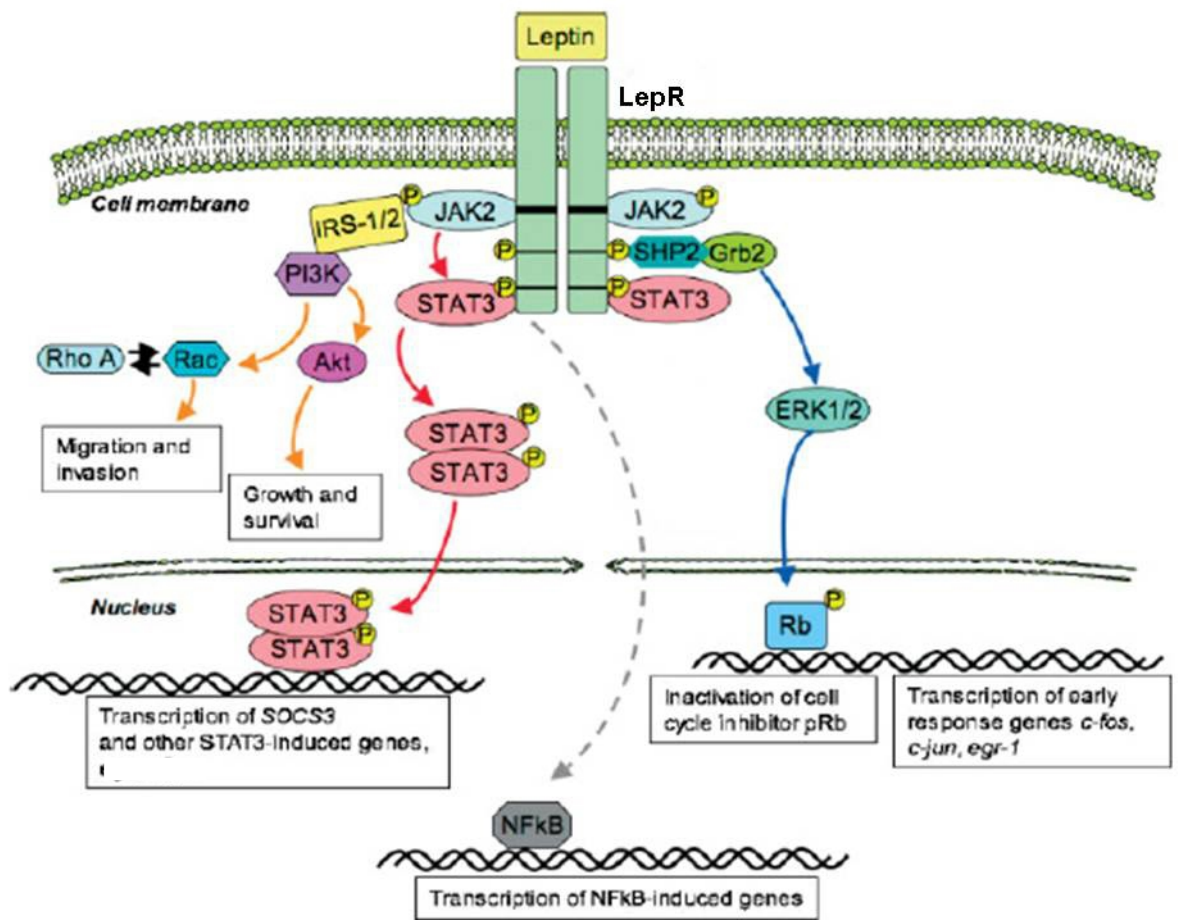


Figura 5: Rappresentazione schematica delle due principali vie di trasduzione del segnale attivate dall'asse leptina/LepR.

fosforilazione del recettore sulla tirosina in posizione 1138, inibendo così la trasmissione del segnale via JAK/STAT indotta dall'interazione tra la leptina e il recettore LepRb (Lavens and al., 2006). Ulteriori possibili vie di segnalazione attivate dall'interazione tra la leptina e il suo recettore sono quella che prevede l'attivazione dell'AMP e porta all'ossidazione degli acidi grassi così come le vie di trasduzione del messaggio mediato dal sistema Rac ed AKT che influenzano la sopravvivenza cellulare (Zabeau et al., 2003; Hegyi et al., 2004).

Leptina e cancro

L'interrelazione esistente tra sviluppo dell'obesità e l'insorgenza e la progressione di diverse forme di tumore è stata ampiamente ipotizzata (Hill, 1999; Sonnenschein et al., 1999) e confermata solo recentemente (Vona-Davis et al., 2009; Lautenbach, 2009; Mazo, 2009), così come è ampiamente accettato che la leptina svolga un ruolo primario nella fisiopatologia dell'obesità (Weigle et al., 1995; Tungtrongchitr et al., 2000; Farooqi, 2009).

Numerosi studi hanno quindi cercato di capire se la leptina potesse svolgere un'attiva azione nella promozione delle forme di tumore in cui l'obesità rappresenta un fattore di rischio, ed inoltre si è cercato, e si cerca ancora, di individuare eventuali che possano influenzare l'azione della leptina nel regolare lo sviluppo e la progressione del cancro (Perrier et al., 2009; Koda et al., 2007). In particolare, negli ultimi anni, numerosi lavori hanno evidenziato come l'azione della leptina potesse regolare l'insorgenza e la progressione del tumore alla mammella e alle ovaie nelle donne in età post-menopausa e del tumore alla prostata negli uomini. È noto che la leptina è essenziale per il normale sviluppo della ghiandola mammaria (Hu et al., 2002; Neville et al., 2002), tuttavia molti studi suggeriscono la possibilità che essa possa svolgere un ruolo primario anche nell'insorgenza di alcune forme di tumore alla mammella (O'Brien et al., 1999; Dieudonné

et al., 2002; Hu et al., 2002; Laud et al., 2002; Okumura et al., 2002; Cleary et al., 2003), infatti è stato dimostrato che l'obesità è un notevole fattore di rischio per lo sviluppo del cancro alla mammella nelle donne in post-menopausa (Cleary et al., 1997; Chlebowski et al., 2002; Rose et al., 2002; Stephenson et al., 2003) soprattutto nei tumori estrogeni dipendenti (Potter et al., 1995; Enger et al., 2000; Huang et al., 2000). Tuttavia la sensibilità agli estrogeni nel tumore alla mammella sembra predisporre a maggiori possibilità terapeutiche, infatti il recettore per gli estrogeni risulta, in queste forme di tumore, uno dei principali target delle numerose terapie anti-neoplastiche (Finn et al., 2009).

I dati finora ottenuti su linee cellulari coltivate *in vitro* hanno dimostrato che l'espressione del recettore LepRb è maggiore nelle linee cellulari sensibili agli estrogeni, $E\alpha$ positive, rispetto a quelle $E\alpha$ negative (Garofalo et al., 2004). È stato riportato che la leptina può indurre la progressione del ciclo cellulare influenzando l'aumento dell'espressione delle cdk2 e dei livelli di ciclina D1 (Okumura et al., 2002) con conseguente iperfosforilazione/inattivazione dell'inibitore del ciclo cellulare pRb (Garofalo et al., 2004). E' stato osservato, inoltre, che in una linea cellulare di tumore alla mammella estrogeno dipendente, linea T47D, la leptina induce non solo la crescita ma anche la trasformazione cellulare; tuttavia tale funzione è stata riscontrata solo in questa linea cellulare e non è stata riscontrata in altre linee cellulari tumorali della mammella estrogeni dipendenti (Hu et al., 2004), per cui tale dato merita un maggiore approfondimento.

È di particolare interesse, quindi, approfondire la relazione esistente tra l'attività della leptina ed il recettore $E\alpha$. Recentemente è stato dimostrato che la leptina può

modulare sia la sintesi degli estrogeni sia l'attività di $E\alpha$. Esperimenti condotti *in vitro* hanno dimostrato che la leptina può indurre sia l'aumento dell'espressione del gene dell'aromatasi, indispensabile per la formazione degli estrogeni, sia l'attività dell'aromatasi stessa (Catalano et al., 2003). Garofalo e collaboratori hanno anche dimostrato che la leptina è in grado di interferire con l'azione degli estrogeni attraverso una regolazione post-trascrizionale dell'espressione di $E\alpha$ (Garofalo et al., 2006).

Tutte queste osservazioni suggeriscono che alti livelli di leptina nelle pazienti obese affette da tumore alla mammella potrebbero contribuire alla crescita tumorale e allo sviluppo della resistenza alle terapie anti estrogeniche che rappresentano efficaci terapie di cura attualmente utilizzate (Garofalo et al., 2004).

Il ruolo svolto dalla leptina sulla progressione del carcinoma ovarico non è ancora stato ben definito (Uddin et al., 2009) anche se il carcinoma ovarico epiteliale (EOC) è una delle principali cause di morte per neoplasie ginecologiche. Gli esperimenti *in vitro* finora sono molto contrastanti in quanto non tutte le linee cellulari derivanti da carcinoma ovarico sono leptina sensibili (Choi et al., 2004). È stato osservato, infatti, che diverse linee cellulari estrogeno dipendenti pur mostrando l'espressione del recettore LepRb non determinano l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale mediate dalla leptina né un aumento della progressione tumorale (Choi et al., 2004). Questi dati suggeriscono quindi che l'attività della leptina nel regolare il tumore alle ovaie potrebbe essere influenzata da fattori non ancora identificati.

L'obesità rappresenta anche un fattore di alterazione nel bilancio degli ormoni sessuali steroidei maschili (Greiser et al., 2000; Chan et al., 2005). Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che la leptina possa avere un ruolo nell'insorgenza del cancro

alla prostata. L'espressione di LepRb, infatti, è stata individuata sia in cellule sane (Cioffi et al., 1996) che in tumori benigni e maligni della prostata (Stattin et al., 2001). Recentemente è stato dimostrato inoltre, che la leptina può aumentare la crescita e la sopravvivenza delle cellule del tumore alla prostata (Onuma et al., 2003). In aggiunta, in alcune linee cellulari prostatiche, la leptina oltre ad effetti mitogenici sembra agire come fattore di motilità e quindi come fattore pro-metastatico (Frankenberry et al., 2004). Tutti questi dati, finora pubblicati, non hanno però determinato in modo univoco il ruolo svolto dalla leptina nel modulare l'insorgenza e la progressione tumorale nel cancro prostatico e pertanto ulteriori studi sono necessari per meglio definire il suo ruolo.

Scopo della tesi

Studi epidemiologici hanno dimostrato un'associazione tra l'obesità e l'aumento del rischio di sviluppare diverse forme di tumore (Garofalo et al., 2006; Calle et al., 2004). La leptina, il prodotto proteico del gene *ob*, è un ormone considerato "sensore" che rivela e segnala al cervello il cambiamento dei livelli delle riserve energetiche, regolando l'assunzione di cibo, ma anche il metabolismo basale e la risposta immunitaria (Lord et al., 1998). La leptina è prodotta principalmente dagli adipociti, fonti secondarie sono la placenta, lo stomaco e il muscolo scheletrico. I livelli di leptina nel sangue sono più elevati nelle donne che negli uomini (Castracane et al., 1998); questo fenomeno potrebbe essere spiegato attraverso la differente regolazione dell'espressione proteica della leptina mediata dagli ormoni sessuali. È stato infatti dimostrato che gli estrogeni aumentano l'espressione della leptina (Hong et al., 2007), mentre il testosterone ne regola negativamente l'espressione (Blum et al., 1997). Negli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi lavori riportanti i diversi, talvolta anche controversi, effetti svolti dalla leptina nel regolare la crescita e la progressione di linee cellulari ottenute da tumori umani. È quindi di notevole rilevanza capire il ruolo svolto dalla leptina nel regolare i meccanismi di trasmissione del messaggio in modo da poter individuare, eventualmente, delle sostanze che potrebbero bloccarne l'azione.

Durante il dottorato di ricerca lo scopo del mio lavoro di tesi è stato quello di studiare il ruolo svolto dalla leptina nel regolare lo sviluppo e la progressione di diverse forme di tumore. Sulla base dei dati presenti in letteratura, sono state selezionate sei linee cellulari derivanti da tumori umani, sia femminili (MCF7, MDA-MB231, SKBR3 e

OVCAR3) che maschili (LNCaP e Du145). In entrambi i casi sono state scelte sia linee cellulari responsive agli estrogeni (MCF7 e OVCAR3) e agli androgeni (LNCaP) sia linee cellulari non responsive a tali ormoni (MDA-MB231, SKBR3 e Du145), per meglio analizzare la possibile relazione tra l'azione svolta dalla leptina e l'espressione degli ormoni sessuali.

Sono stati inizialmente condotti esperimenti atti a rivelare la sensibilità delle linee cellulari al trattamento con la leptina mediante saggi di vitalità e proliferazione cellulare al fine di analizzare la capacità della leptina di influenzare questi parametri nelle diverse linee cellulari utilizzate.

Successivamente è stato valutato l'effetto svolto dall'anticorpo monoclonale 9F8, gentilmente fornito dal Dott. Giuseppe Matarese del CNR, che lega e blocca il recettore della leptina, nel modulare l'azione della leptina sulla vitalità e sulla proliferazione cellulare nonché sull'attivazione delle vie di trasmissione del messaggio regolate dai sistemi delle MAPK e di STAT3.

I dati ottenuti *in vitro* hanno suggerito di valutare l'azione dell'anticorpo di interferire con la crescita tumorale anche *in vivo* utilizzando topi inoculati con una linea cellulare tumorale (MCF7)

Inoltre, per osservare una possibile correlazione tra l'espressione del recettore Era e quella di LepR, abbiamo deciso di condurre esperimenti di RNA *interference* sulle linee cellulari MCF7, estrogeno dipendenti, e MDA-MB231, non estrogeno dipendenti.

Infine per valutare se realmente esistesse una interrelazione tra il recettore E_{α} e LepR, abbiamo effettuato un'analisi *ex-vivo* della loro espressione su campioni di tessuti ottenuti da pazienti operati per un tumore alla mammella a diverso grado di malignità.

Tutti i dati così ottenuti sono stati analizzati per valutare l'interrelazione esistente fra l'azione della leptina, l'attivazione del suo recettore e la regolazione dell'espressione di E_{α} .

Procedure sperimentali

1. Reagenti

I terreni di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ed X-Vivo, gli antibiotici (penicillina, streptomicina) e gli aminoacidi (L-glutamina) sono stati forniti dalla Life Technologies (BioWittaker, USA).

Il Siero Fetale Bovino (FCS) è stato acquistato dalla Hyclone Lab (Logan, UT). L'MTT è stato acquistato dalla Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Per gli esperimenti *in vitro*, l'anticorpo umano bloccante il recettore della leptina, mAb 9F8, è stato gentilmente donato dal Dott. Giuseppe Matarese (IEOS-CNR, Napoli). La leptina umana ricombinante, rlepina, è stata acquistata da R&D Systems, USA. Per l'analisi biochimica, gli anticorpi usati sono: anti-STAT3, diluito 1:2000 e anti-phospho-STAT3 (Y705) diluito 1:1000 (Cell Signaling Technology, USA); anti-LepR diluito 1:500, anti-ER α (HC-20) diluito 1:500, anti-ERK 1/2 diluito 1:3000, and anti-phospho-ERK1/2 diluito 1:1000 (tutti forniti da Santa Cruz Biotechnology Inc., CA). I filtri sono stati incubati con un anticorpo anti-tubulina diluito 1:2000 (Sigma, USA) per normalizzare la quantità di proteina caricate sul gel..

2. Linee cellulari umane

- La linea cellulare MCF7: ottenuta da un adenocarcinoma umano della mammella sensibile agli estrogeni.
- La linea cellulare MDA-MB231: ottenuta da un carcinoma umano della mammella non sensibile agli estrogeni.

- La linea cellulare SKBR3: ottenuta da un carcinoma umano della mammella non sensibile agli estrogeni.
- La linea cellulare OVCAR3: ottenuta da un carcinoma umano ovarico sensibile agli estrogeni.
- La linea cellulare LnCaP: ottenuta da un adecarcinoma umano della prostata non sensibile agli androgeni.
- La linea cellulare Du145: ottenuta da un carcinoma umano della prostata sensibile agli androgeni.

Colture cellulari

Le cellule sono state cresciute in terreno di coltura DMEM addizionato con: 10% di FCS, 1% di glutammina (50 Unità/ml) e 1% di streptomicina e penicillina (50 Unità/ml). Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37 °C in atmosfera umidificata di 95% aria e 5% di CO₂.

3. Trattamento con la rleptina ed estrazione proteica

Per valutare l'effetto della rleptina e dell'anticorpo monoclonale 9F8 sulle diverse linee cellulari, ogni campione cellulare, raggiunta la confluenza di circa l'80% è stato sottoposto a sincronizzazione per 16 ore e successivamente sono stati aggiunti 100 ng/ml di rleptina in presenza o in assenza di 25 ng/ml di 9F8. Tutti i trattamenti sono stati effettuati per due ore. Tale tempo rappresenta il periodo ottimale di interazione fra la

leptina, l'anticorpo ed il recettore. Trascorso tale tempo di interazione sono state estratte le proteine.

Le cellule sono state staccate dalla piastra utilizzando tripsina-EDTA e centrifugate a 1200 rpm per 3 minuti, il precipitato è stato risospeso in 1 ml di PBS (soluzione salina) sterile e ulteriormente centrifugato a 1200 rpm per 10 minuti. Il supernatante è stato eliminato ed il precipitato è stato incubato per 30 minuti in ghiaccio con il tampone di lisi (10 ml/gr di cellule) (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% Np-40, 80 µl di una miscela di inibitori di proteasi (Roche,USA).

Trascorso tale periodo i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 12000 rpm, a 4°C, il supernatante recuperato. La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il kit "Protein Assay" della BioRad.

4.Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

È stato preparato un gel alla concentrazione del 12% o dell'8% di Acrilammide/Bisacrilammide, secondo la metodica di Laemmli delle dimensioni di 83 x 58 x 0,75 mm.

Il rapporto Acrilammide/Bisacrilammide è nel "Separating gel" rispettivamente di 12%:0.32% e 8:0.32% mentre nello "Stacking gel" è sempre di 5%:0.13%. A 50 µg di ogni campione sono stati aggiunti 6,67 µl di un tampone contenente Tris-HCl 0,8 M pH 6,8, SDS 8%, 2-mercaptoetanolo 20%, Glicerolo 40%, Blu di Bromofenolo 0,004%. I campioni sono stati bolliti per 5 minuti prima di essere caricati sul gel. L'elettroforesi è stata condotta a voltaggio costante (100 V) per circa 2 ore.

5. Western blotting

Le proteine separate in SDS-PAGE, come riportato nel paragrafo precedente, sono state trasferite su di un filtro di nitrocellulosa Hybond-C (GE-Healthcare, UK) ed analizzate per individuare tramite l'interazione con un anticorpo primario la presenza di specifiche proteine di interesse. Le proteine a cui sono legate molecole di SDS, sono cariche negativamente e quindi, sotto l'effetto di un campo elettrico, si spostano verso l'anodo e si trasferiscono in tal modo sul filtro di nitrocellulosa dal quale vengono trattenute. Il tampone utilizzato per il trasferimento è Tris (0,25 M)-Glicina (1,89 M) pH 7.4 e 20% Metanolo. Il *Western blotting* è stato effettuato ad una temperatura di 4°C per circa 3 ore, mantenendo un voltaggio costante di 100 V sotto agitazione magnetica costante. Per controllare il trasferimento, il filtro è stato colorato con Rosso Ponceau (Ponceau 2%, TCA (Acido Tricloroacetico) 3%) per circa 3 minuti e decolorato con vari cambi in H₂O bidistillata.

Preparazione del filtro e rivelazione con ECL

Il filtro, sul quale sono presenti le proteine di interesse, è stato preincubato per 2 ore a 4°C all'interno di una vaschetta contenente 10 ml di una *blocking solution* (5% di latte liofilizzato, 0.5% Tween-20 in PBS 1x). Il filtro è stato quindi lavato con circa 10 ml di PBS-T (0.5% Tween-20 in PBS 1x) per circa 30 minuti e successivamente incubato con lo specifico anticorpo primario per 1 ora a temperatura ambiente. Il filtro è stato lavato, come prima, per allontanare l'eccesso di anticorpi e incubato per 30 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi di rafano in diluizione

1:2000 (GE-Healthcare, UK). La rivelazione delle proteine presenti sul filtro è stata effettuata mediante il kit ECL PLUS della GE-Healthcare, UK. Il filtro è stato asciugato con carta Whatman 3MM ed incubato con le soluzioni A e B in un rapporto 40:1 (0.1 ml/cm²) per 5 minuti a temperatura ambiente in modo che avvenisse la reazione chemioluminescente. Il filtro è stato tamponato per eliminare il reagente in eccesso ed è stato poi adagiato in una cassetta di esposizione al di sopra di un supporto di carta assorbente ed esposto ad una lastra Fuji. La durata dell'esposizione può variare da pochi minuti ad un'ora.

6. Saggio MTT

Il saggio serve ad individuare, in una popolazione cellulare, le cellule vitali ed è basato sulla riduzione dei sali di tetrazolio, con la formazione di cristalli insolubili purpurei di formazano, solubilizzati però dall'aggiunzione di uno specifico detergente, il DMSO (Dimetil Solfo). In una piastra da 96 pozzetti, sono state piastrate 5×10^3 cellule di ognuna delle diverse linee cellulari analizzate e cresciute in incubatore. Raggiunta una percentuale di confluenza di circa l'80%, le cellule sono state sincronizzate per 16 ore. Per l'esperimento sono stati utilizzati due tipi di mezzi, il DMEM addizionato o meno con il 2% di FCS o il mezzo X-Vivo; l'aggiunta di una piccola quantità di siero è utile per la presenza degli elementi nutritivi, mentre il terreno di crescita X-Vivo garantisce l'assenza di qualsiasi fonte esogena di leptina. Terminata l'incubazione le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti (0,1,10,100 ng/ml) di leptina ricombinante (rleptina) in presenza o in assenza dell'anticorpo monoclonale (mAb 9F8)

capace di bloccare il recettore per la leptina (LepR) (Fazeli et al., 2006) per 24 ore. Dopo tale incubazione è stato eliminato il supernatante e le cellule sono state trattate con 100µl di una soluzione di MTT al 5% ed incubate 4 ore a 37°C. Alla fine dell'incubazione è stato eliminato il supernatante, sono stati aggiunti 100µl di DMSO ed è stato incubato per 5 minuti in agitazione a temperatura ambiente. Finita l'incubazione è stata letta l'assorbanza a 492 nm.

7. Saggio di proliferazione cellulare

2 x 10⁴ cellule/pozzetto sono state piastrate in una piastra da 96 pozzetti con 0,05 ml dell'opportuno mezzo di crescita. Raggiunta l'80% di confluenza, le cellule sono state sincronizzate, per una notte, in tre mezzi di crescita totalmente privi di siero fetale bovino (X-Vivo e DMEM) o con una percentuale del 2% di FCS (DMEM 2% siero) e quindi incubate con rleptina (1,10,100 ng/ml) o mAb9F8(25 ng/ml) per 24 ore a 37°C. Il giorno seguente, alle colture cellulari è stata aggiunta [3H] thymidine (0.5 µCi/pozzetto) (GE-Healthcare, UK) per ulteriori 12 ore. Terminato il periodo d'incubazione, la radioattività è stata misurata con un β-cell-plate scintillation counter (Wallac, USA).

8. Saggi di funzionalità di mAb 9F8 in vivo

L'esperimento sugli animali è stato condotto in accordo con le leggi italiane sulla sperimentazione animale (Workman, 1998). I topi femmine BALB/c-nu+/nu+, caratterizzati da un sistema immunitario deficitario per facilitare l'insorgenza del tumore, di età 5-6 settimane, sono stati ottenuti da Harlan-Italia, Italia e trattati con estrogeni prima

dell'inoculo e anche durante il periodo dell'esperimento. 5×10^5 cellule MCF7 sono state risospese in 200 μ l di PBS sterile ed iniettate sotto cute a ciascun topo. I topi sono stati divisi in 2 gruppi; di cui uno è stato successivamente utilizzato come controllo per seguire la crescita esponenziale della massa tumorale, l'altro è stato utilizzato per il trattamento con mAb 9F8. Quando i tumori sono stati visibili, mAb 9F8, sciolto in PBS, è stato somministrato nell'area peritumorale, in concentrazione di 25 ng/ml. Le iniezioni sono state effettuate per 3 volte ad intervalli di 72 ore. Il volume della massa tumorale (V) è stato misurato due volte a settimana e calcolato con la formula dell'ellissoide rotazionale fino a quando i tumori nei topi di controllo sono diventati troppo grandi per proseguire l'esperimento.

9. RNA interference

Per l'infezione delle due linee cellulari, MCF7 e MDA-MB 231, 4×10^5 di cellule sono state piastrate e, raggiunta la semiconfluenza, sono state infettate con 2.5×10^7 TU/ml particelle virali per 24 ore in presenza di polibrene (3 μ g/ml) (Sigma, USA). Trascorso tale periodo le cellule sono state usate per i diversi saggi.

11. Selezione dei pazienti

I campioni sono stati ottenuti dalla banca dei pazienti operati per il cancro alla mammella a diverso grado di malignità dal Dipartimento di Patologia dell'Istituto Nazionale dei Tumori (INT) "G.Pascale" di Napoli. La selezione è stata effettuata usando, come parametro, l'elevata positività o negatività dei tumori della mammella al recettore

per gli estrogeni. Sono stati così analizzati 33 pazienti affetti da tumore alla mammella. 19 con alta espressione di ER α e 14 con assenza di ER α .

12. Analisi Immunoistochimica

Tutte le tecniche di immunoistochimica sono stati eseguite su sezioni di tessuto incluse in 4 μ m di paraffina. Prima dell' incubazione con l'anticorpo primario, le sezioni sono state trattate in un forno a microonde a 650W per tre cicli in una soluzione di 0,01 mol/l di sodio citrato (pH 6) per eliminare la paraffina. Gli anticorpi utilizzati sono stati: anti-recettore della leptina LepR (M-18, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA); anti-recettore dell'estrogeno (ER-1D5, Dako, Danimarca) e anti-recettore del progesterone (PgR-636, Dako, Denmark) . Le sezioni sono state incubate prima, con immunoglobuline biotinilate per 20 minuti a temperatura ambiente, poi con la perossidasi marcata con streptavidina per 20 minuti (perossidasi Detection System, Novocastra Laboratories Ltd, UK) e successivamente è stato utilizzata la diaminobenzidina come substrato cromogenico. I nuclei sono stati messi in evidenza con ematossilina. La valutazione è stata effettuata considerando la percentuale di cellule neoplastiche che esprimono i recettori. L' espressione di LepR è stata considerata elevata quando oltre il 50% delle cellule neoplastiche ne presentavano l'espressione.

13. Analisi statistica

Il Mann-Whitney U-test è stato utilizzato per effettuare l'analisi statistica con il programma Graphpade. I dati sono stati espressi come la media \pm SD di tre esperimenti.

The Fisher's χ^2 test è stato utilizzato per stabilire se vi fosse una significativa relazione tra l'espressione di LepR e di ER α nei campioni analizzati.

Risultati

EFFETTO DELLA LEPTINA SULLE LINEE CELLULARI

Allo scopo di osservare se, la leptina potesse attivare le principali vie di trasduzione del segnale, sono stati condotti esperimenti nelle linee cellulari MCF7, MDA-MB 231, SKBR3, OVCAR3, DU145 e LNCaP (fig.6).

Gli esperimenti hanno indicato che, nelle linee cellulari derivanti da tumori estrogeno positivi, MCF7 e OVCAR3, il trattamento con la leptina determina un'incremento delle MAPKs rispettivamente di circa il 100% nelle cellule MCF7 e circa il 70% nelle cellule OVCAR3 (fig.6A).

Nelle linee cellulari non estrogeno dipendenti, le SKBR3 e le MDA-MB231, non si osserva, invece, alcuna attivazione delle MAPKs (fig.6B).

Tali osservazioni sembrano suggerire che la sensibilità alla leptina sia in relazione alla sensibilità agli estrogeni.

Gli esperimenti condotti stimolando con la leptina le cellule derivanti da tumori prostatici maschili androgeno dipendenti, LNCaP, e non androgeno dipendenti, Du145, hanno evidenziato un'attivazione delle MAPKs di circa il 75% nelle cellule LNCaP (fig.6C) mentre non si rivela alcun effetto sulle cellule Du145 (fig.6C).

Allo scopo di individuare quindi se il trattamento con la leptina potesse indurre l'attivazione dei fattori di trascrizione STAT3, sono stati condotti ulteriori esperimenti nelle varie linee cellulari (fig.7). Il trattamento con la leptina induce l'attivazione

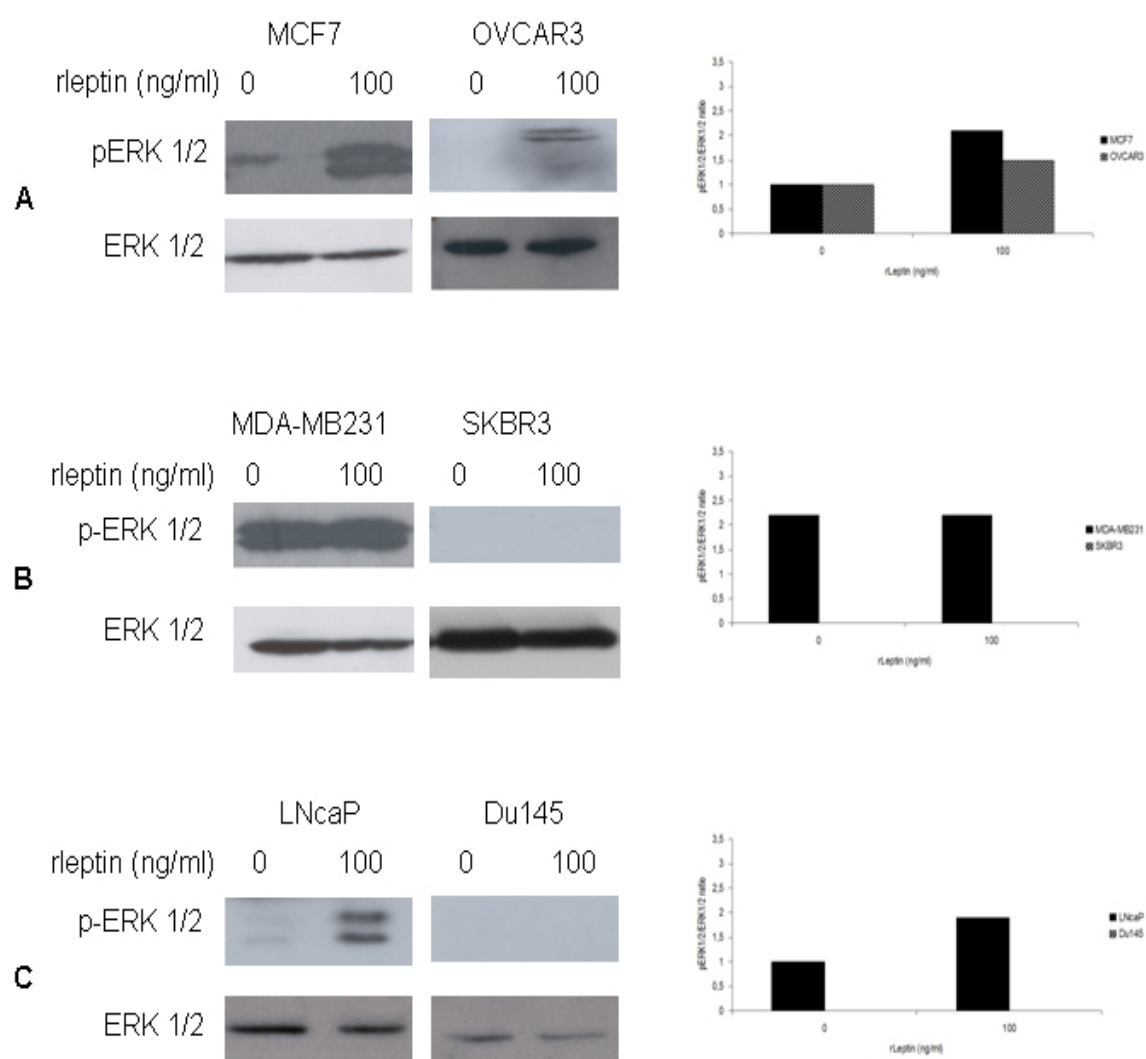


Figura 6: Analisi dei livelli di espressione di p-ERK1/2 mediante Western blotting. A: espressione di p-ERK1/2 in cellule MCF7 e OVCAR3; B: espressione di p-ERK1/2 in cellule MDA-MB231 e SKBR3; C: espressione di p-ERK1/2 in cellule LNcaP e Du145. L'analisi densitometrica è stata effettuata in rapporto all'espressione basale di ERK1/2.

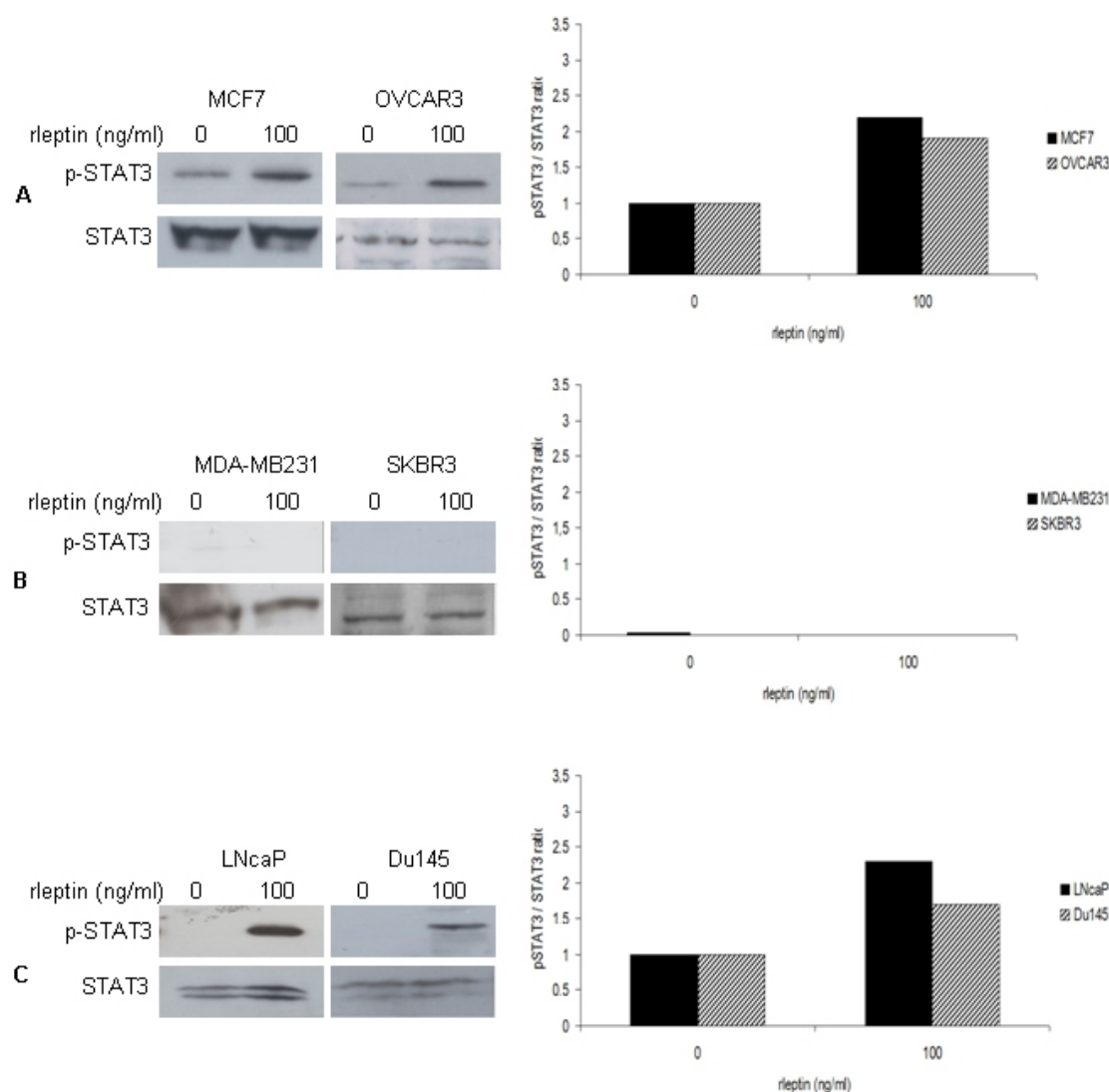


Figura 7: Analisi dei livelli di espressione di p-STAT3 mediante Western blotting.

A: espressione di p-STAT3 in cellule MCF7 e OVCAR3; B: espressione di p-STAT3 in cellule MDA-MB231 e SKBR3; C: espressione di p-STAT3 in cellule LNcaP e Du145. L'analisi densitometrica è stata effettuata in rapporto all'espressione basale di STAT3.

dell'espressione di STAT3 in entrambe le linee cellulari, MCF7 e OVCAR3, che già avevano mostrato un incremento delle MAPK (fig.6A). Nelle due linee cellulari MDA-MB231 e SKBR3 invece, non si osserva alcun incremento dell'espressione delle proteine STAT3 (fig.7B). La coerenza di questi dati sembra rafforzare l'ipotesi di una stretta relazione tra l'azione della leptina e azione degli estrogeni.

Nelle linee cellulari androgeniche, il trattamento con la leptina induce l'attivazione delle proteine STAT3, con un incremento di circa il 100%, nelle cellule LNcaP (fig.7C) e di circa il 90% nelle cellule Du145. Tale dato appare in accordo con i dati riguardanti l'attivazione delle MAPKs nelle LNcaP ma sembra in apparente disaccordo con quello riguardante la linea non androgeno dipendente Du145, tuttavia in letteratura sono riportati dati in cui è evidenziato che la leptina può indurre l'attivazione contemporanea della due principali vie di trasduzione del segnale (MAPKs e STAT3) ma può anche produrre l'attivazione di una sola via di segnalazione e ciò dipende dalle linee cellulari utilizzate (Cirillo et al.,2008).

I dati ottenuti sulle linee prostatiche, da noi utilizzate, sembrano smentire l'ipotesi di una possibile relazione tra la sensibilità alla leptina e la dipendenza dagli androgeni, ma i controversi dati, esistenti anche in letteratura, suggeriscono di approfondire l'analisi dell'azione della leptina anche mediante l'utilizzo di altre linee cellulari.

EFFETTO DELLA LEPTINA SULLA VITALITA' E LA PROLIFERAZIONE**CELLULARE**

L'attivazione delle vie di trasduzione del segnale, mediate sia dall'attivazione delle MAPKs che dall'asse JAK/STAT, sono associate alla regolazione di fenomeni come la sopravvivenza, la proliferazione e l'invasione cellulare, l'infiammazione e la trasformazione neoplastica nonché la formazione di metastasi (Aggarwal et al., 2009). L'attivazione di queste vie di trasduzione del segnale anche da parte della leptina ha, quindi, suggerito di effettuare esperimenti di vitalità e di proliferazione cellulare, utilizzando dosi crescenti di leptina, al fine di individuare la presenza di un eventuale concentrazione soglia.

Gli esperimenti di vitalità e proliferazione cellulare sono stati condotti in diverse condizioni, come riportato nelle procedure sperimentali, al fine di non avere fonti esogene di leptina (terreno X-Vivo) o di considerare la presenza o meno nel siero fetale bovino di piccole quantità di leptina endogena (terreno DMEM \pm 2% di FCS).

Gli esperimenti di vitalità cellulare, condotti utilizzando la metodica MTT, hanno evidenziato che, nelle linee cellulari MCF7 e OVCAR3, l'attivazione delle due vie di trasduzione del segnale, si traduce in un aumento della vitalità cellulare in maniera dose-dipendente (fig.8). Inoltre si osserva che tale effetto è marcato quando le cellule sono cresciute nel terreno di coltura X-Vivo (fig.8A), mentre esso è parzialmente mascherato nel terreno di crescita DMEM, sia quando è addizionato con il 2% di siero fetale bovino (fig.8B) sia quando ne è completamente privo (fig.8C). Queste osservazioni suggeriscono

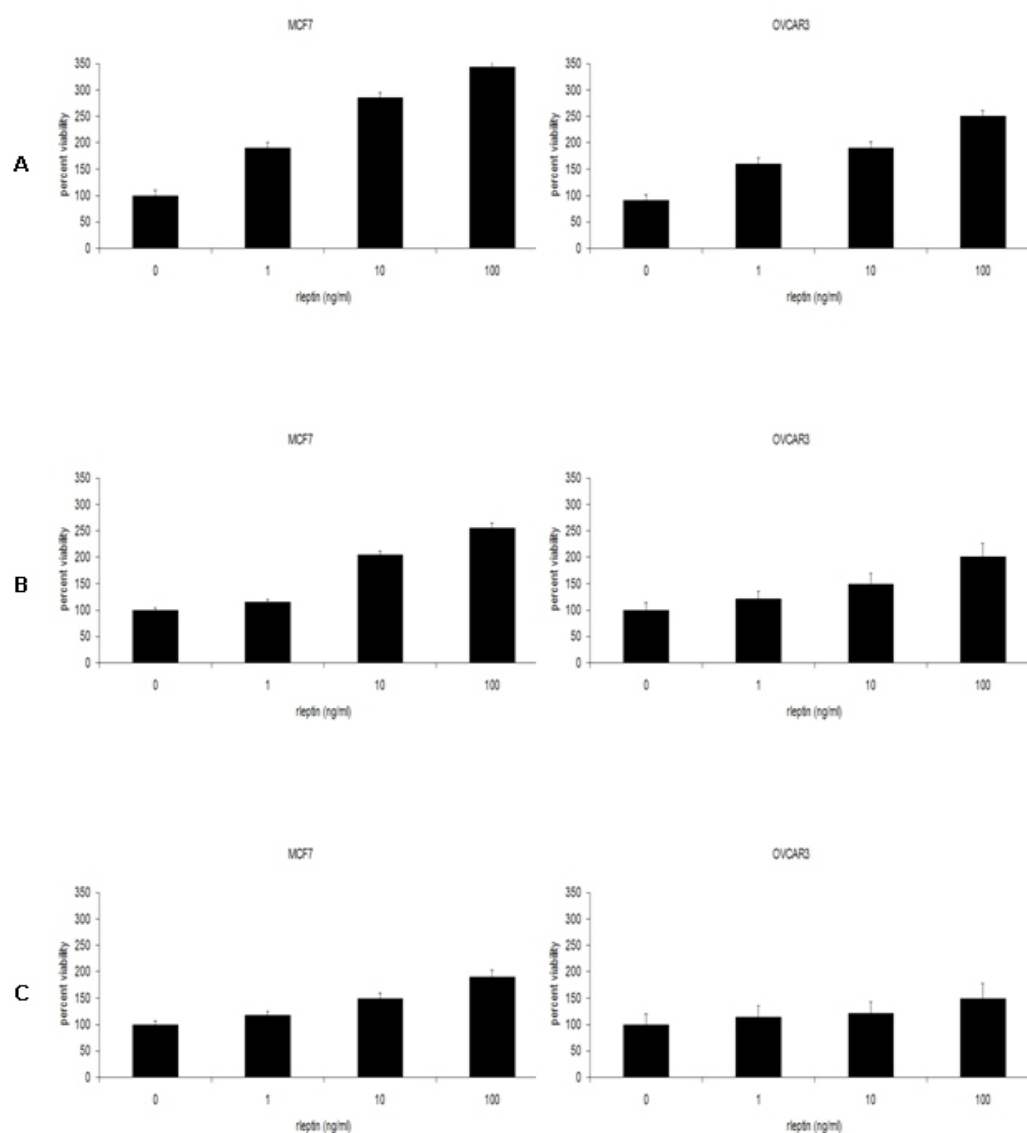


Figura 8: Saggio di vitalità cellulare, MTT, condotto sulle linee cellulari estrogeno responsive, MCF7 e OVCAR3.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

che nel FCS è presente una piccola quantità di leptina che, probabilmente, diminuisce il numero di recettori LepR liberi per il legame con la leptina esogena.

I dati riguardanti l'effetto della leptina sulla vitalità delle linee cellulari MDA-MB231 e SKBR3 mostrano, in accordo con i dati di attivazione della trasduzione del segnale, una totale insensibilità alla leptina di tali linee cellulari indipendentemente dai terreni di crescita nei quali esse vengono coltivate (fig.9). Dall'analisi della vitalità condotta sulle linee cellulari prostatiche, LNcaP e Du145 (fig.10), si evince che la leptina induce, in maniera dose-dipendente, un aumento della vitalità delle cellule non androgeno dipendente, linea Du145, ed inoltre conferma che l'effetto della leptina sulla vitalità cellulare è maggiore quando le cellule sono poste nel mezzo di coltura X-Vivo (fig.10A) rispetto alle condizione in cui le cellule sono mantenute nel terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di siero fetale bovino (fig.10B) o privo di siero (fig.10C). La leptina non sembra avere alcun effetto sulla vitalità cellulare delle cellule prostatiche LNcaP (fig.10).

L'aumento della vitalità cellulare non implica, necessariamente, un aumento della proliferazione cellulare, quindi, al fine di chiarire se l'aumento della vitalità cellulare fosse associato ad una maggiore capacità proliferativa, sono stati effettuati esperimenti di incorporazione di timidina marcata con il trizio ($[^3\text{H}]$ timidina) nelle condizioni descritte precedentemente per i saggi di vitalità cellulare.

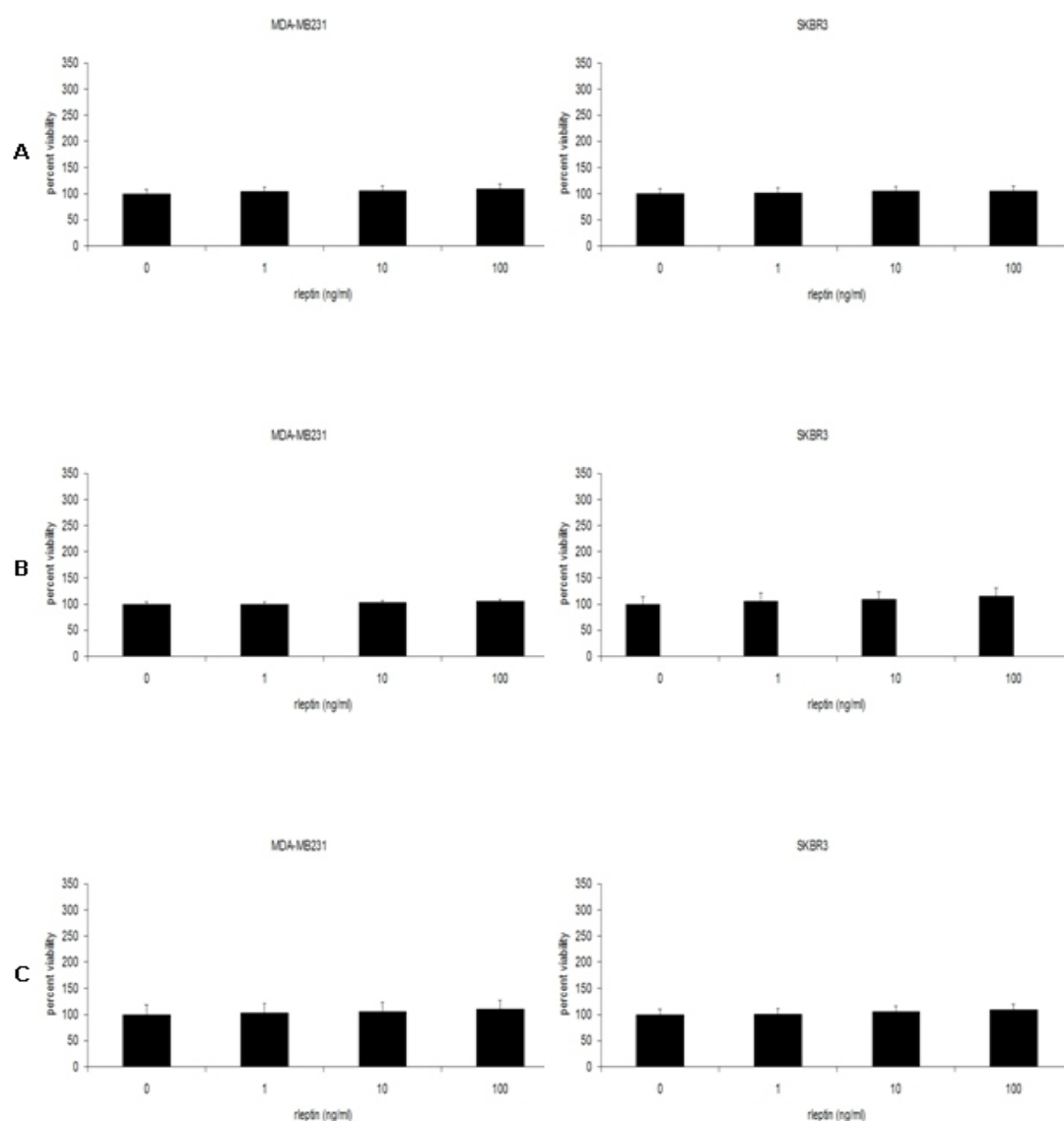


Figura 9: Saggio di vitalità cellulare, MTT, condotto sulle linee cellulari non estrogeno responsive, MDA-MB231 e SKBR3.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

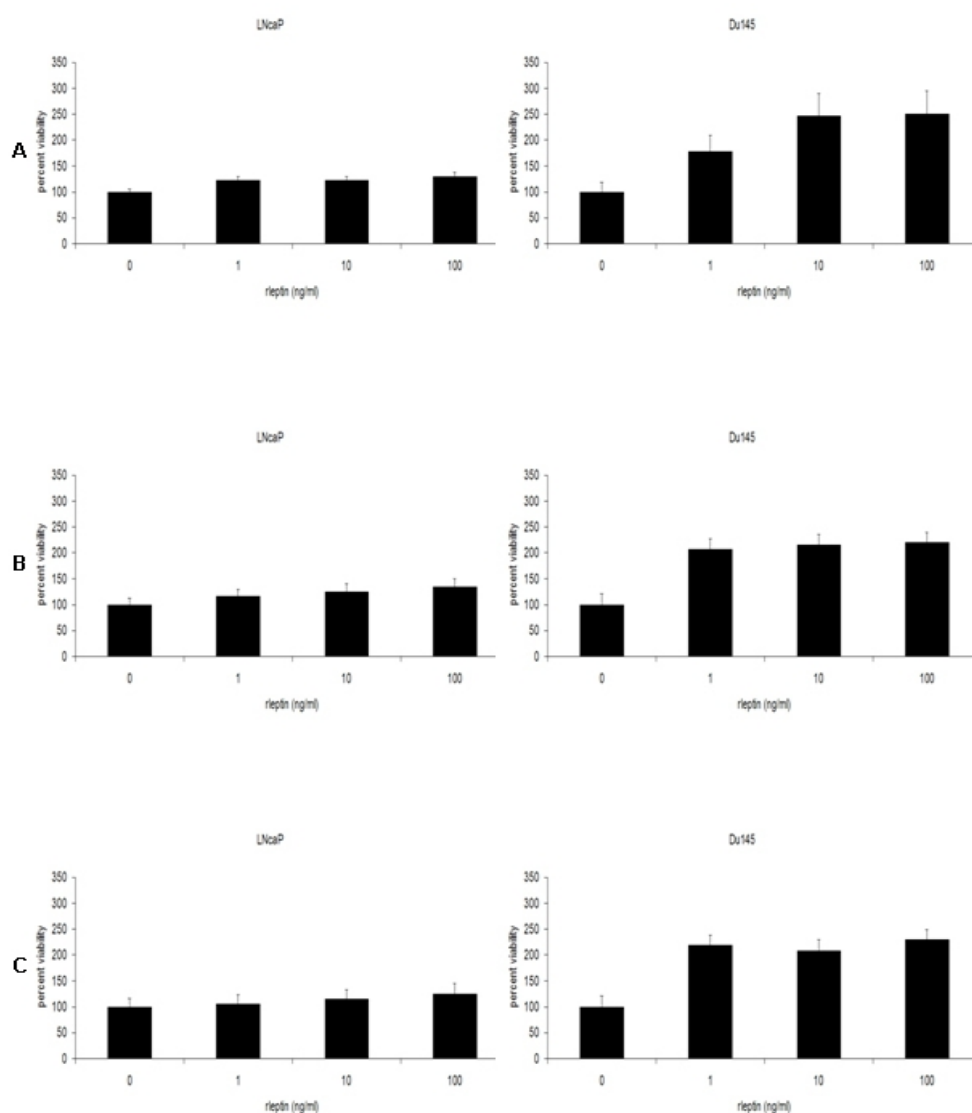


Figura 10: Saggio di vitalità cellulare condotto sulle linee cellulari prostatiche, LNcaP e DU145.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

L'incorporazione della timidina radioattiva ha evidenziato che nelle cellule MCF7 e OVCAR3 l'aumento della vitalità cellulare è giustificato da un aumento della proliferazione cellulare indotta dalla leptina (fig.11). In accordo con i dati ottenuti dai saggi di attivazione e di vitalità, la proliferazione delle cellule estrogeno dipendenti è indotta dalla leptina in maniera dose-dipendente ed inoltre tale fenomeno è maggiore quando le linee cellulari sono cresciute nel terreno X-Vivo (fig.11). Analizzando gli effetti della leptina sulla proliferazione delle linee MDA-MB231 e SKBR3 si nota come l'ormone, in perfetto accordo con i dati di attivazione e di vitalità cellulare, non mostri alcuna azione su tali linee cellulari (fig.12).

L'analisi della proliferazione cellulare condotta sulle cellule LNcaP e Du145 (fig.13), mostra che la leptina induce, in maniera dose-dipendente, un aumento della proliferazione delle cellule Du145 ed inoltre conferma che tale azione è maggiore quando le cellule sono coltivate nel mezzo di crescita X-Vivo (fig.13A) rispetto alle condizione in cui le cellule sono coltivate in DMEM con 2% di siero fetale bovino (fig.13B) o in DMEM totalmente privo di siero (fig.13C).

Il trattamento con la leptina delle cellule LNcaP non sembra avere alcun effetto sulla loro proliferazione cellulare (fig.13).

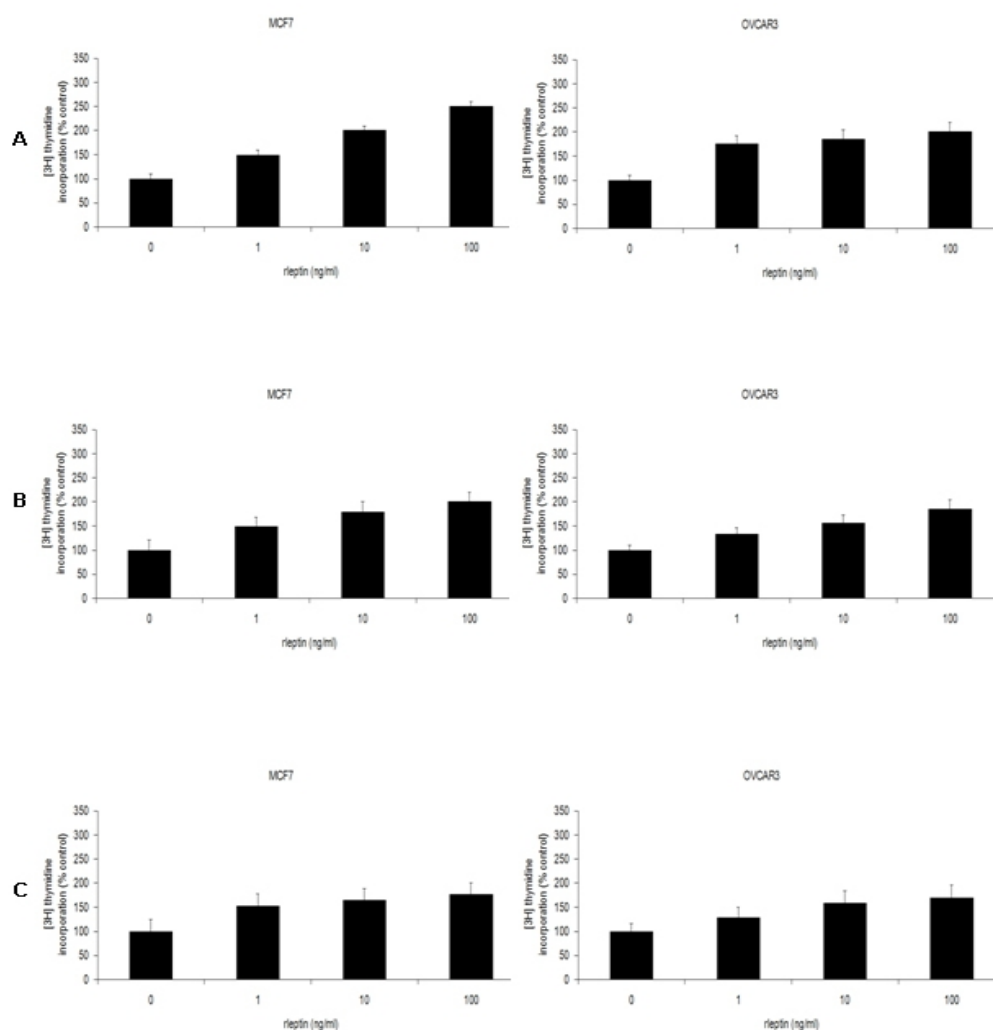


Figura 11: Saggio di proliferazione cellulare condotto sulle cellule MCF7 e OVCAR3.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

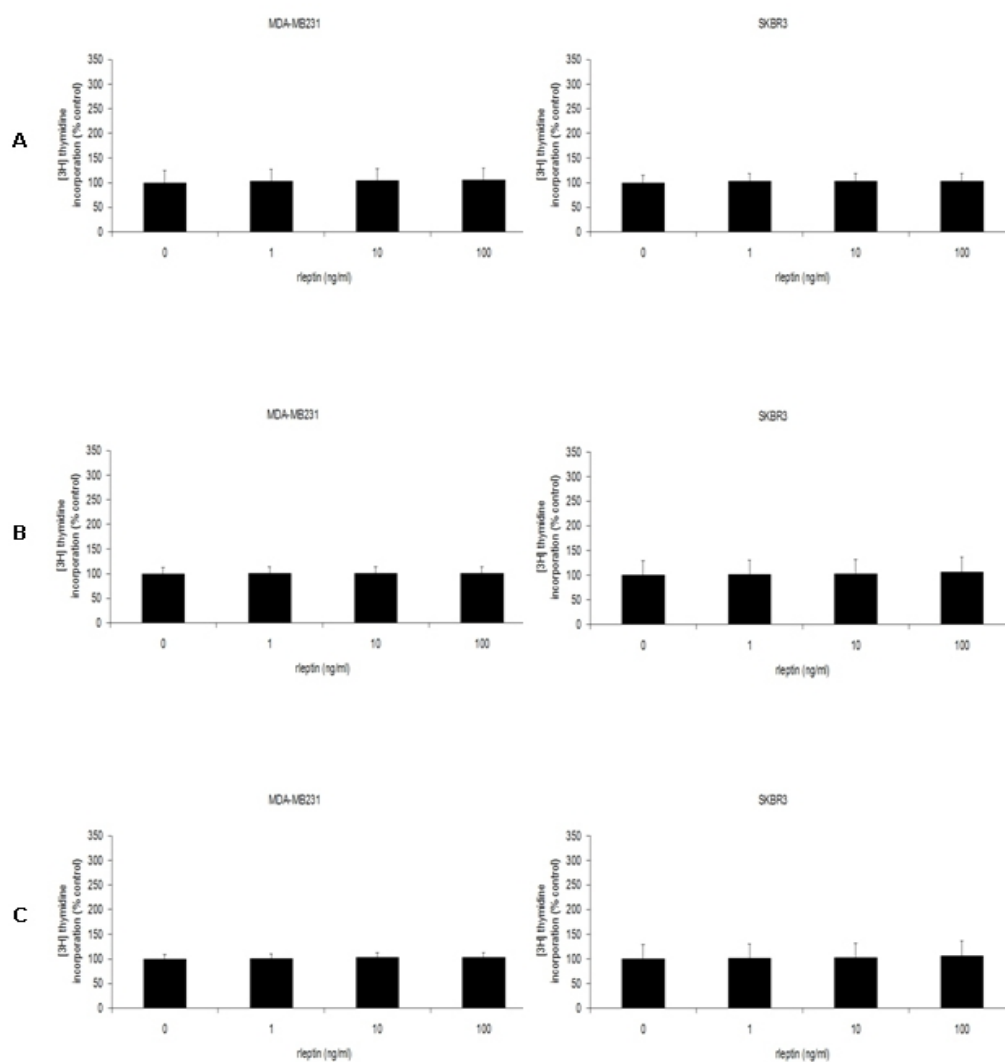


Figura 12: Saggio di proliferazione cellulare condotto sulle linee cellulari non estrogeno responsive, MDA-MB231 e SKBR3.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

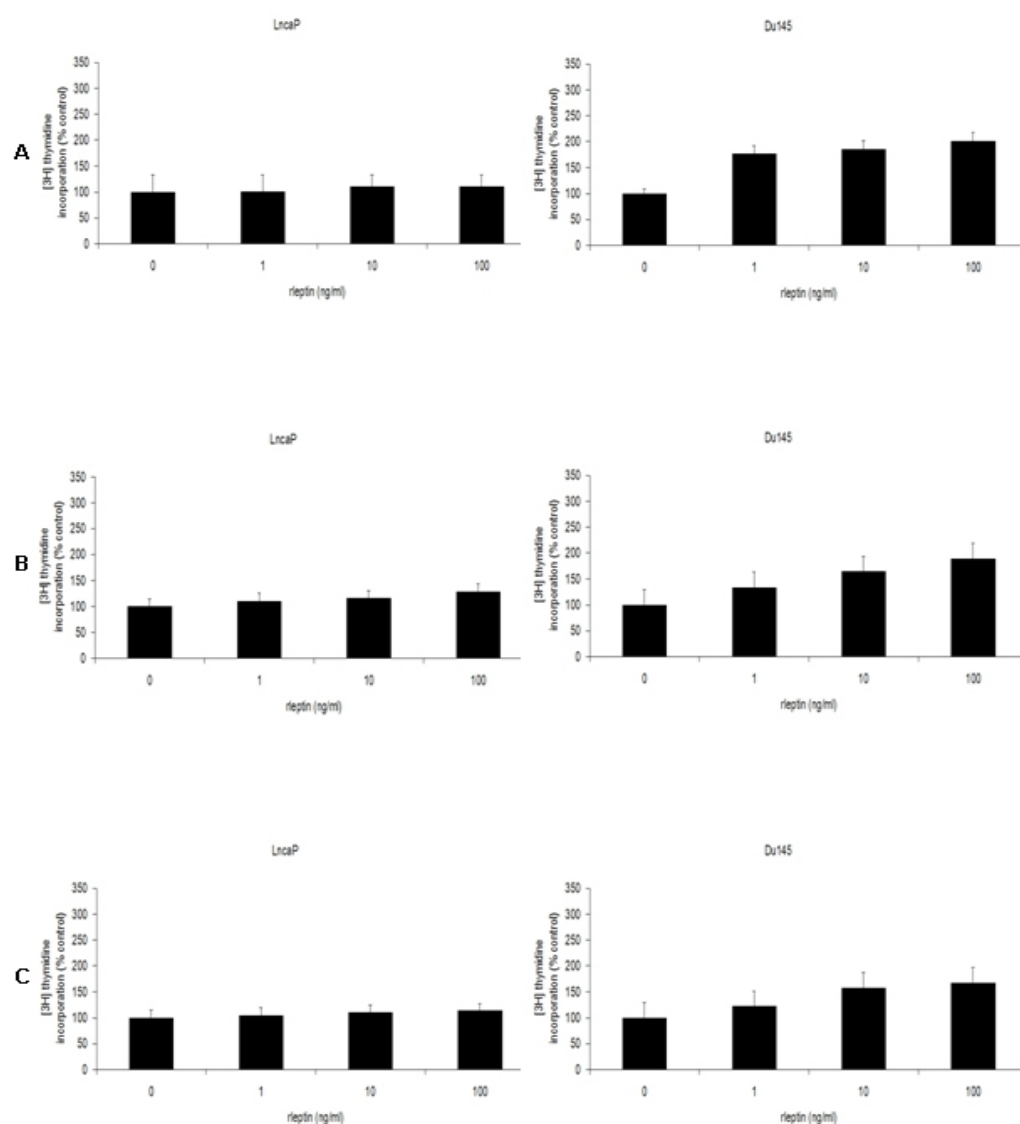


Figura 13: Saggio di proliferazione cellulare condotto sulle linee cellulari prostatiche, LNCaP e DU145.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

ESPRESSIONE DEL RECETTORE LepR

I dati ottenuti, sulle diverse linee cellulari, avendo mostrato una diversa risposta al trattamento con la leptina, hanno indotto a pensare che la differente sensibilità potesse essere associata all'assenza, in alcune linee cellulari, del recettore LepR. Abbiamo, quindi, condotto esperimenti volti ad analizzare l'espressione del recettore LepR (fig.14). Dai dati ottenuti risulta evidente che l'espressione del recettore per la leptina è aumentata dal trattamento con la leptina stessa nelle linee cellulari MCF7 e OVCAR3 (fig.14A), mentre esso non è espresso nelle cellule MDA-MB231 e SKBR3 (fig.14B).

Le due linee prostatiche LNCap e Du145 mostrano invece, rispetto al controllo, una maggiore espressione di LepR (fig.14C) quando stimulate con rleptina.

Tuttavia la sensibilità di tali linee cellulari è inferiore a quella nelle linee estrogeno dipendenti, MCF7 e OVCAR3.

AZIONE DI mAb9F8 SULLE FUNZIONI DELLA LEPTINA

Nel 2006 Fazeli e collaboratori hanno prodotto un anticorpo monoclonale 9F8 capace di legare il recettore LepR bloccandone l'attivazione, promossa dalla leptina.

Tale attivazione è stata osservata nei monociti e nelle cellule T umane (Fazeli et al., 2006). Per osservare se tale anticorpo, ottenuto dal Dott. Giuseppe Matarese (IEOS, CNR) fosse in grado di inibire gli effetti della leptina sulle linee cellulari analizzate, abbiamo condotto esperimenti stimolando le cellule con la leptina in

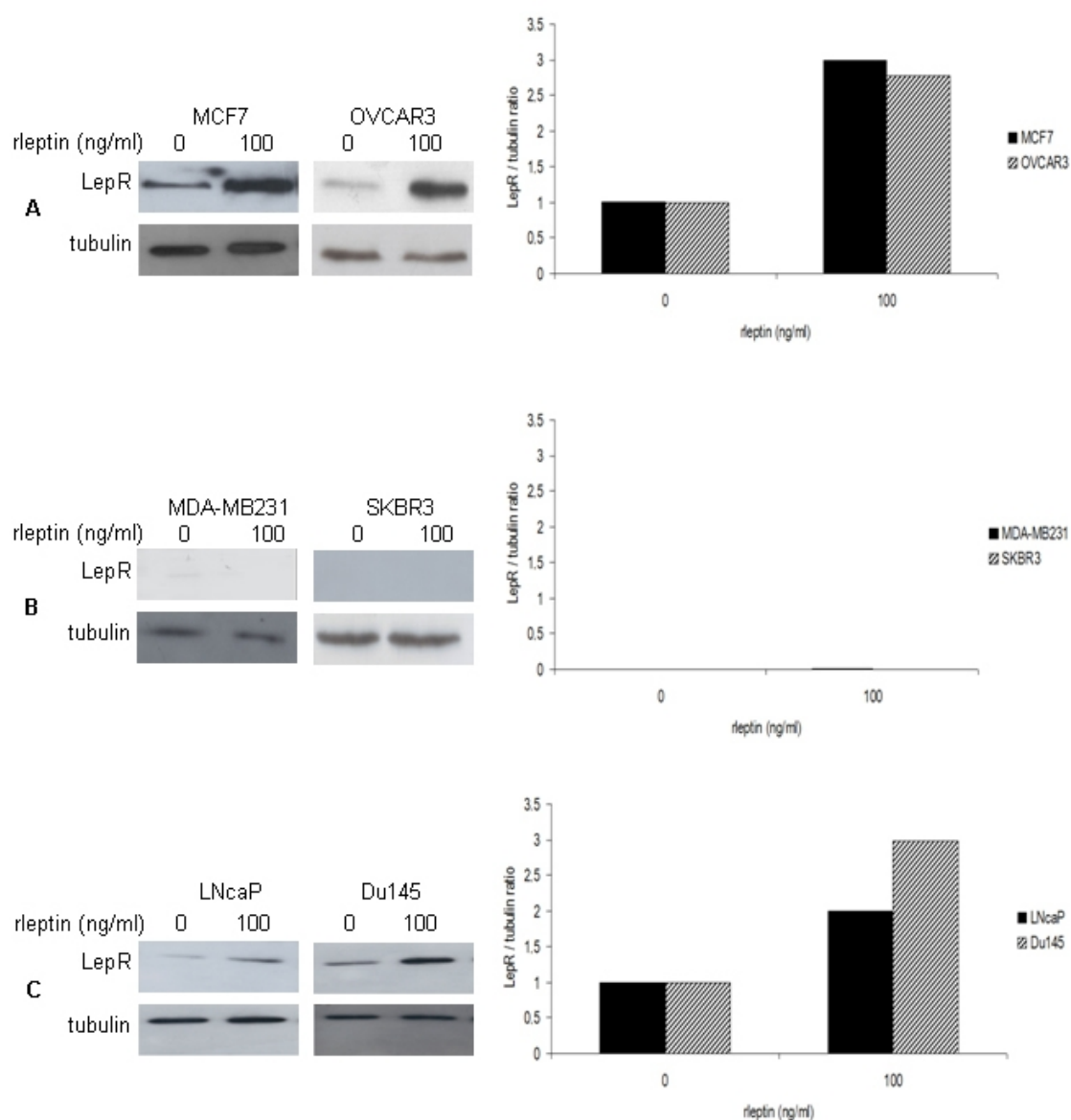


Figura 14: Analisi dei livelli di espressione di LepR mediante Western blotting.

A: espressione di LepR in cellule MCF7 e OVCAR3; B: espressione di LepR in cellule MDA-MB231 e SKBR3; C: espressione di LepR in cellule LNcaP e Du145.

L'analisi densitometrica è stata effettuata in rapporto all'espressione della tubulina.

presenza del mAb9F8 ed analizzando l'effetto di tale stimolazione sulle vie di trasduzione del segnale.

L'azione del mAb9F8 sulle linee cellulari MCF7 e OVCAR3 risulta in una totale inibizione dell'attivazione leptina dipendente della via delle MAPKs (fig.15A) e di STAT3 (fig.15B). Nessun effetto si riscontra sulle linee cellulari MDA-MB231 e SKBR3 (fig.16A e fig.16B). L'anticorpo monoclonale 9F8 ha un effetto inibitorio sull'azione della leptina anche nelle cellule prostatiche (fig.17), sia nell'attivazione delle MAPKs (fig.17A) sia nell'attivazione di STAT3 (fig.17B).

Al fine di confermare il totale effetto inibitorio del mAb9F8 sull'azione della leptina, sono stati effettuati esperimenti di vitalità e proliferazione cellulare nelle condizioni descritte in precedenza. Il legame dell'anticorpo al recettore della leptina risulta in un'inibizione totale dell'azione di quest'ultima sulla vitalità e sulla proliferazione cellulare per le cellule MCF7 e OVCAR3 (fig.18-19), mentre non è stato osservato alcun effetto per le linee cellulari MDA-MB231 e SKBR3 (fig.20-21). L'anticorpo inibisce la vitalità e la proliferazione delle cellule Du145 (fig.22) e non mostra alcun effetto, come atteso, sulle cellule LNCaP (fig.23).

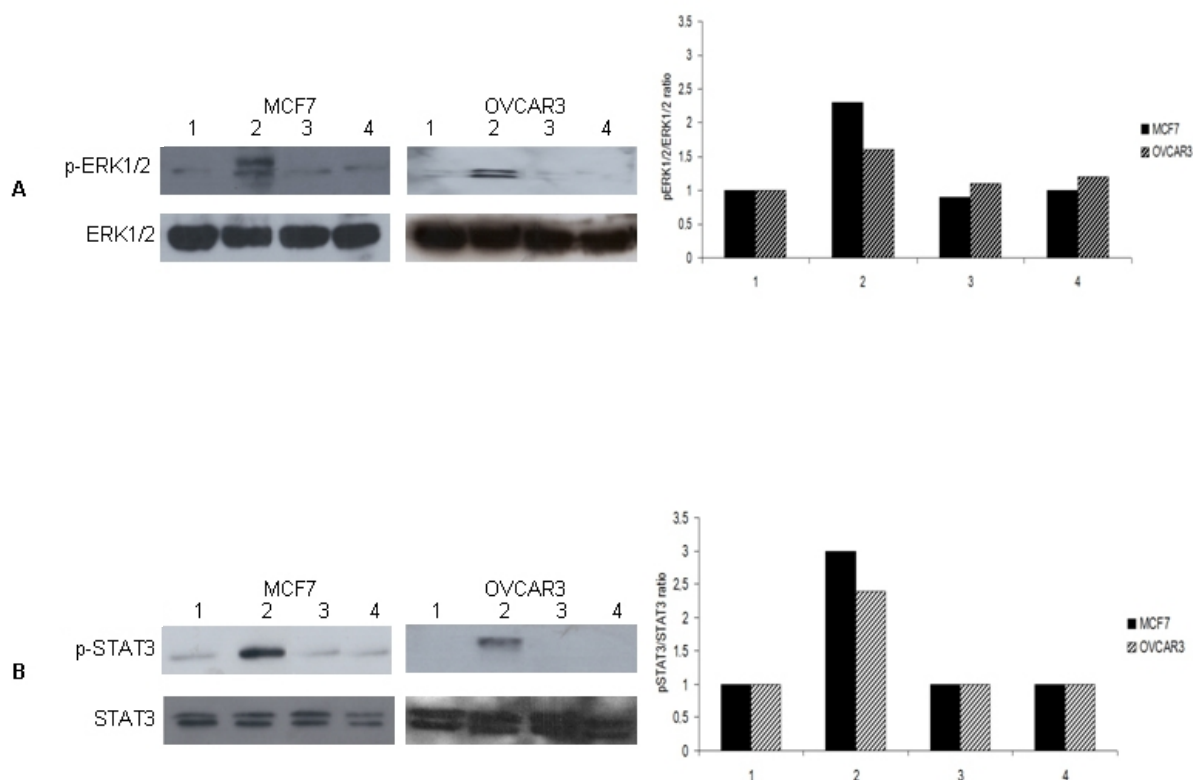


Figura 15: Analisi dei livelli di espressione di p-ERK1/2 e di p-STAT3, nelle cellule MCF7 e OVCAR3, mediante Western blotting.

Linea1:controllo; linea2: trattamento con la rleptina; linea3: trattamento con 9F8; linea4: trattamento con rleptina e anticorpo 9F8.

A: L'analisi densitometrica dell'espressione di p-ERK1/2 è stata effettuata in rapporto all'espressione basale di ERK1/2 .

B: L'analisi densitometrica dell'espressione di p-STAT3 è stata effettuata in rapporto all'espressione basale di STAT3.

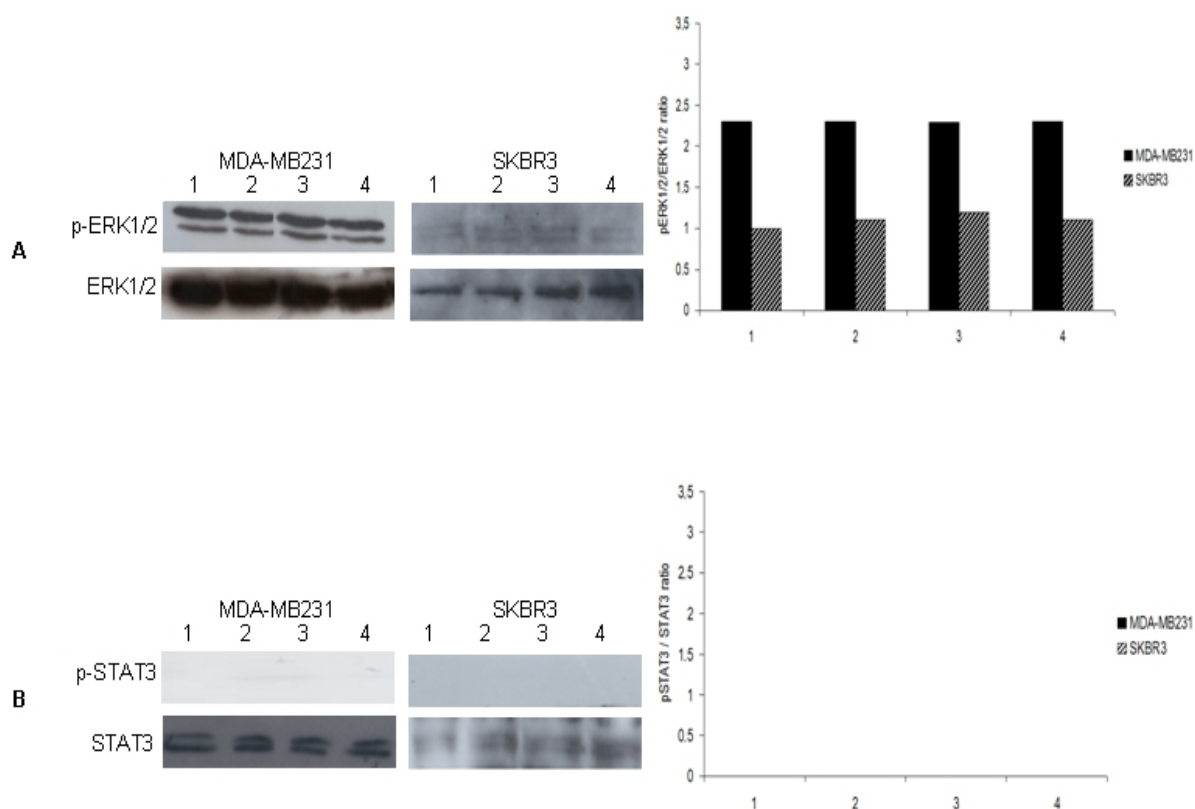


Figura 16: Analisi dei livelli di espressione di p-ERK1/2 e di STAT3, nelle cellule MDA-MB231 e SKBR3, mediante Western blotting.

Linea1:controllo; linea2: trattamento con la rleptina; linea3: trattamento con 9F8; linea4: trattamento con rleptina e anticorpo 9F8.

A: L'analisi densitometrica dell'espressione di p-ERK1/2 è stata effettuata in rapporto all'espressione basale di ERK1/2 .

B: L'analisi densitometrica dell'espressione di p-STAT3 è stata effettuata in rapporto all'espressione basale di STAT3.

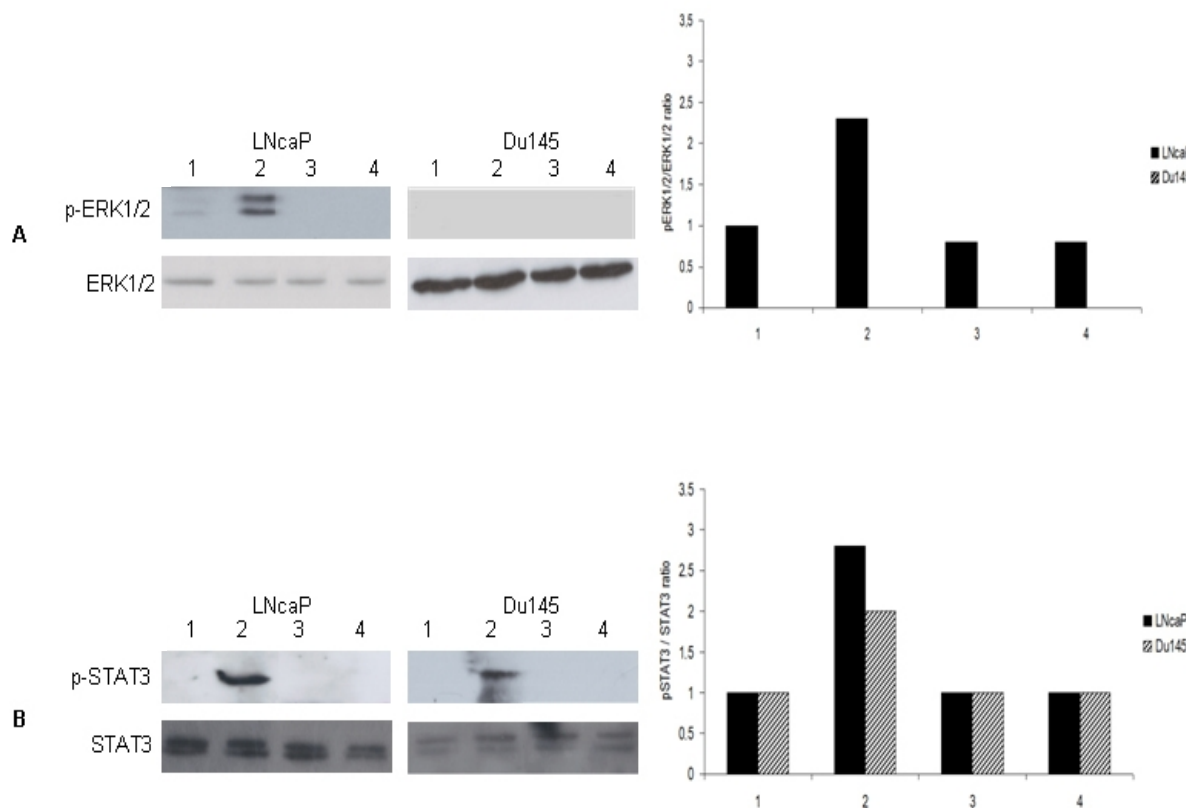


Figura 17: Analisi dei livelli di espressione di p-ERK1/2 e di STAT3, nelle cellule LNcaP e Du145, mediante Western blotting.

Linea1:controllo; linea2: trattamento con la rleptina; linea3: trattamento con 9F8; linea4: trattamento con rleptina e anticorpo 9F8.

A: L'analisi densitometrica dell'espressione di p-ERK1/2 è stata effettuata in rapporto all'espressione basale di ERK1/2 .

B: L'analisi densitometrica dell'espressione di p-STAT3 è stata effettuata in rapporto all'espressione basale di STAT3.

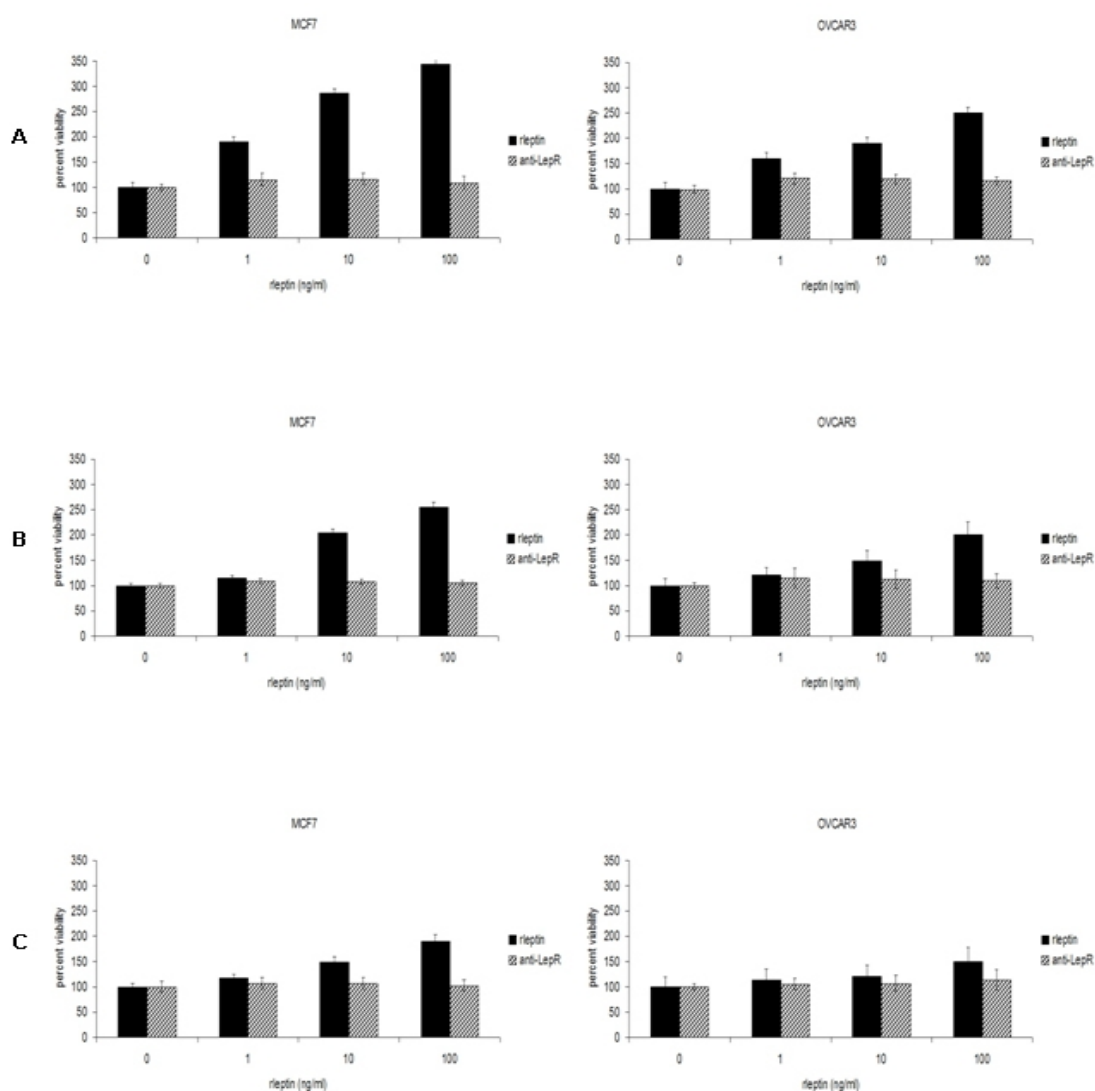


Figura 18: Saggio di vitalità condotto sulle linee cellulari prostatiche, LNCaP e DU145.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

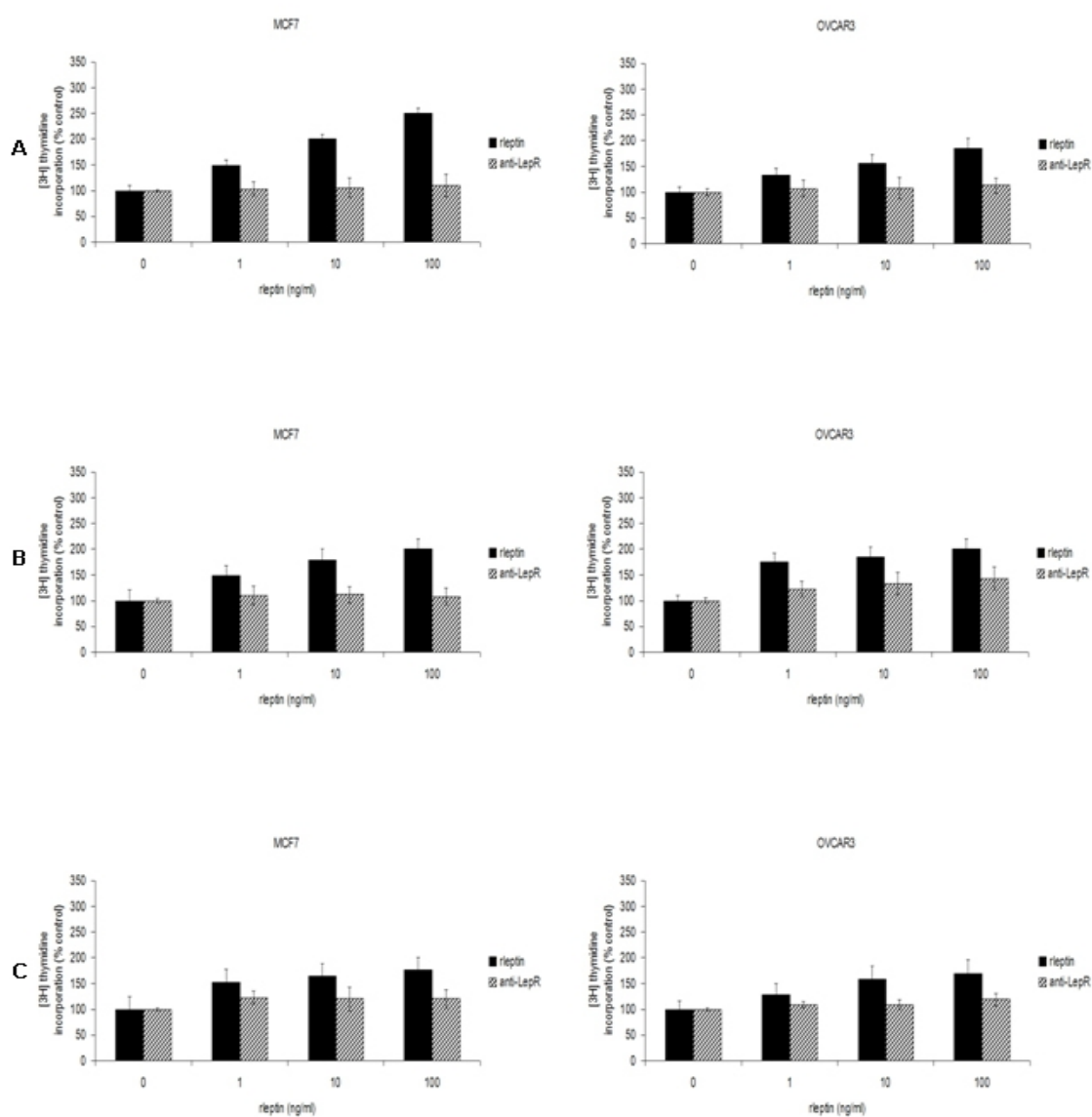


Figura 19: Saggio di proliferazione cellulare condotto sulle cellule MCF7 e OVCAR3 in presenza dell'anticorpo monoclonale 9F8.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

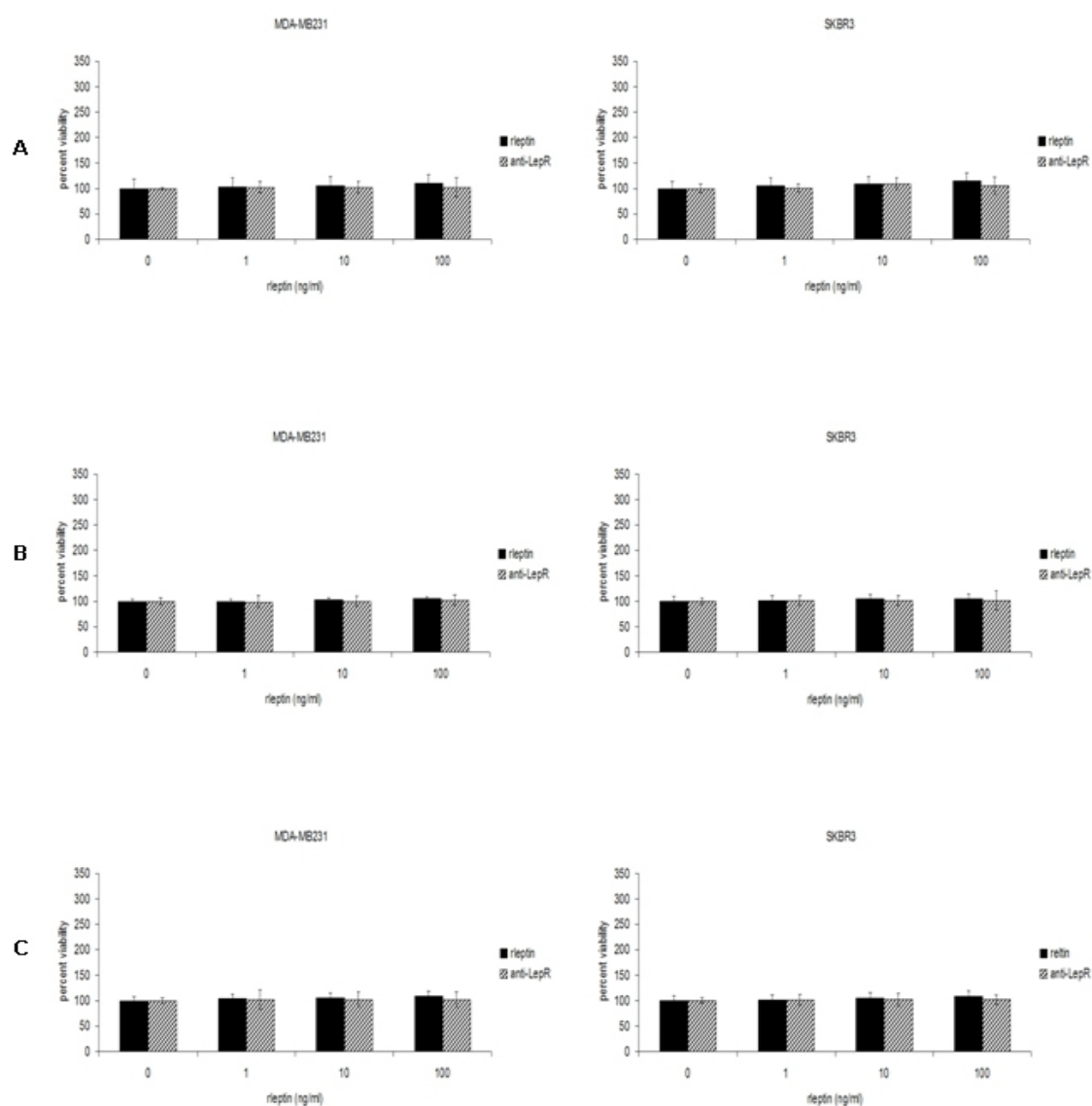


Figura 20: Saggio di vitalità cellulare condotto sulle cellule MDA-MB231 e SKBR3 in presenza dell'anticorpo monoclonale 9F8.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

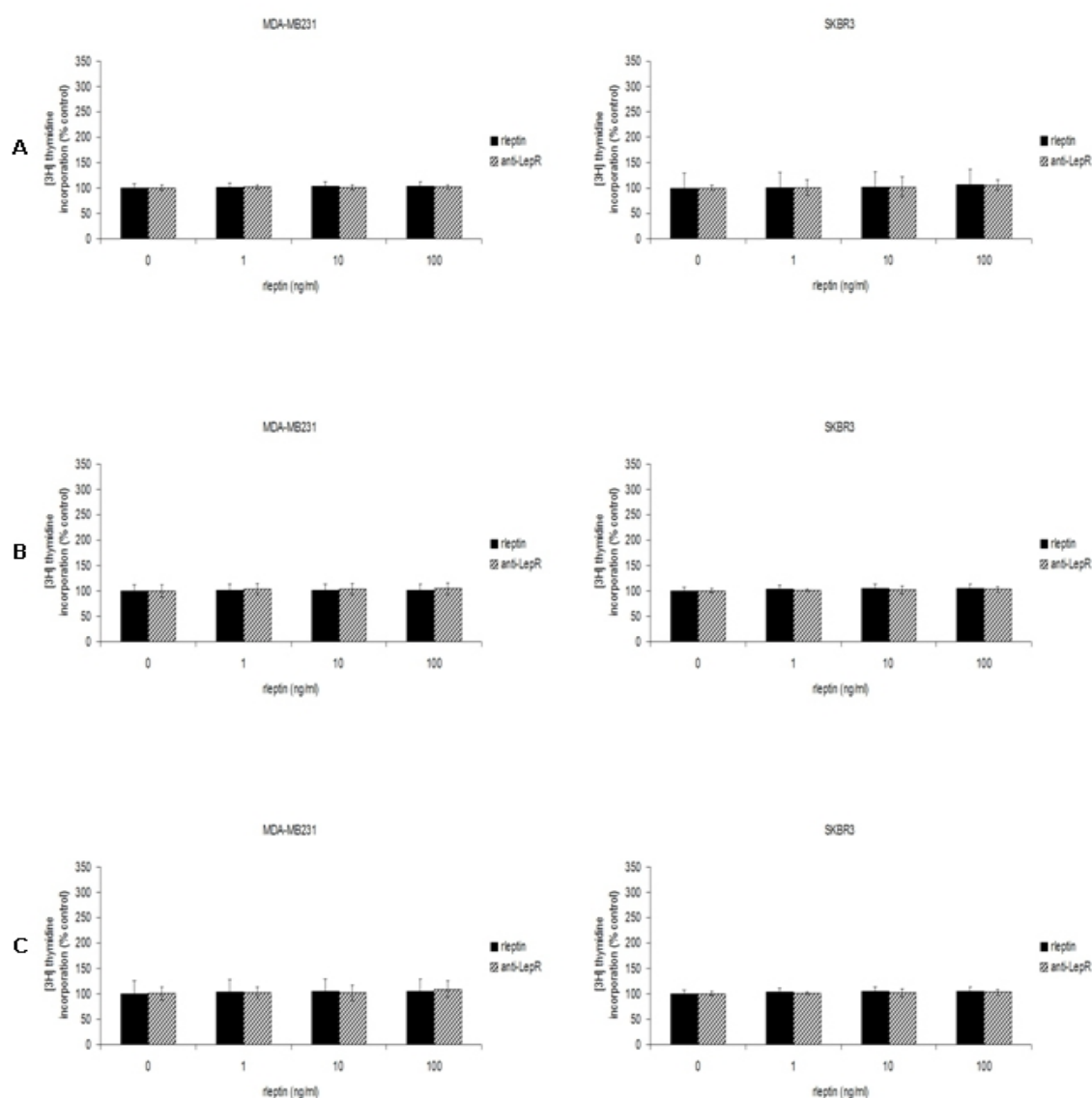


Figura 21: Saggio di proliferazione cellulare condotto sulle cellule MDA-MB231 e SKBR3 in presenza dell'anticorpo monoclonale 9F8.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

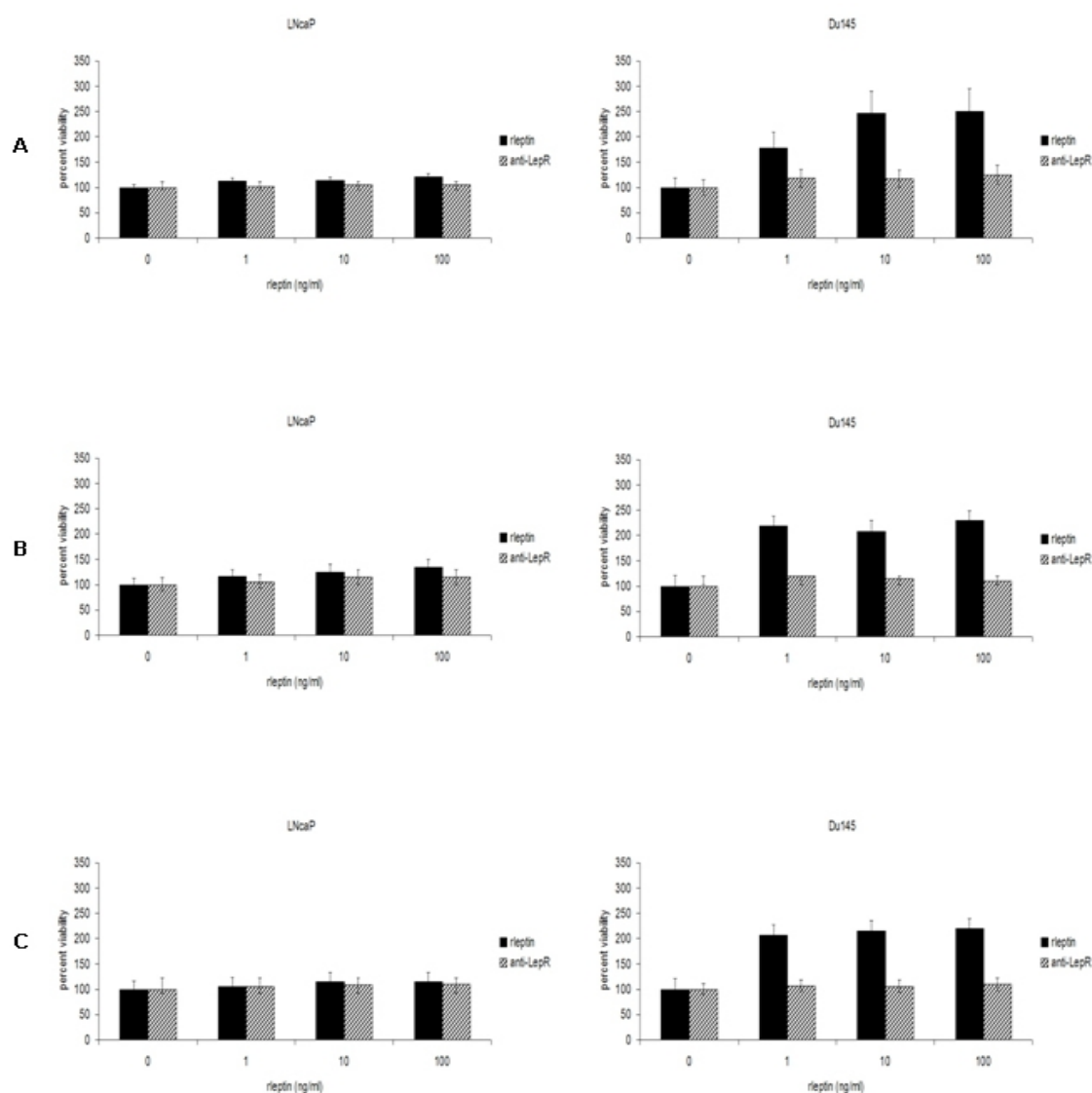


Figura 22: Saggio di vitalità cellulare condotto sulle cellule LNcaP e Du145 in presenza dell'anticorpo monoclonale 9F8.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

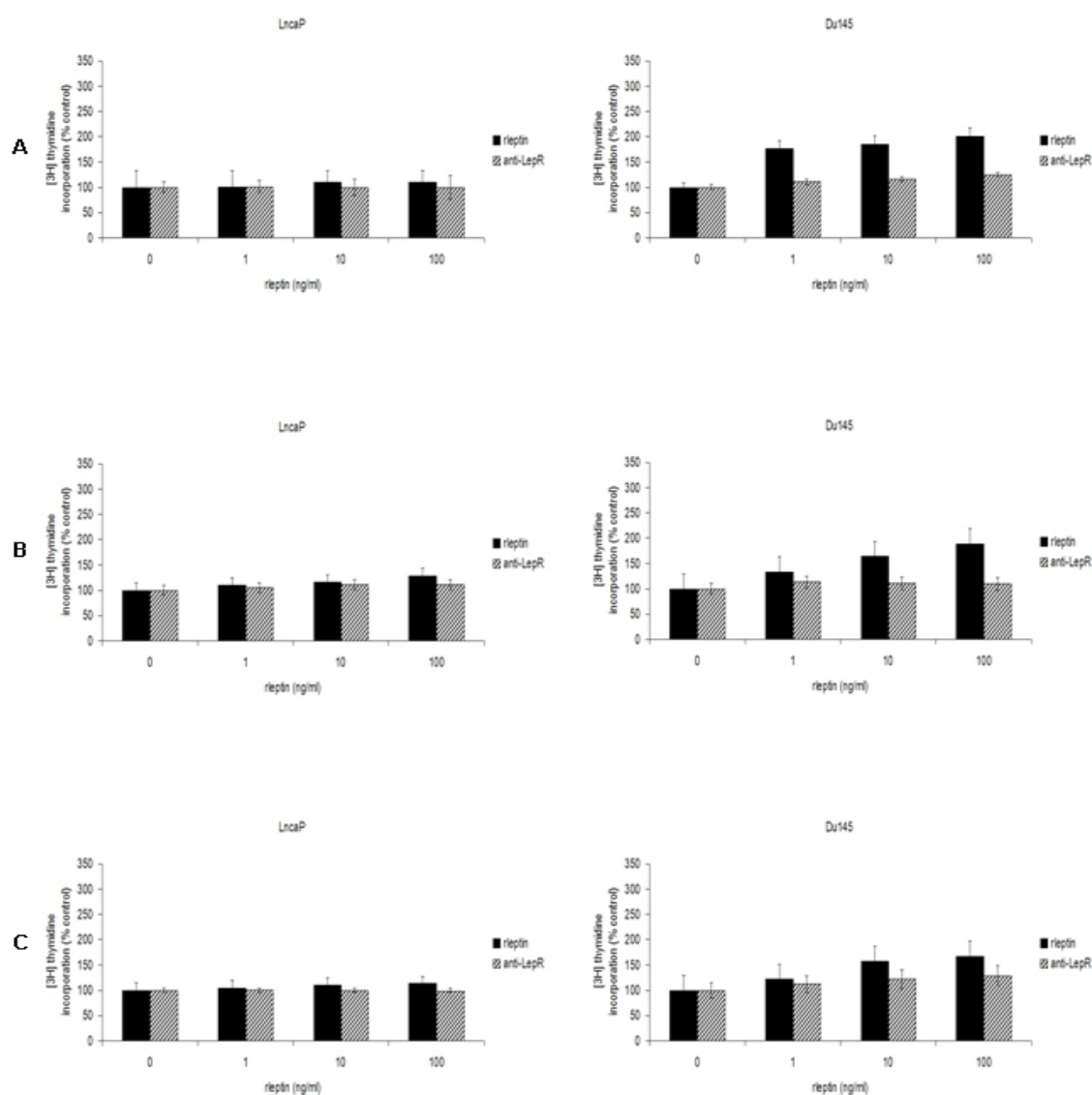


Figura 23: Saggio di proliferazione cellulare condotto sulle cellule LNcaP e Du145 in presenza dell'anticorpo monoclonale 9F8.

A: terreno di coltura X-Vivo; B: terreno di coltura DMEM addizionato con 2% di FCS; C: terreno di coltura DMEM completamente privo di FCS. I dati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

SAGGI IN VIVO DEL mAb9F8

Gli esperimenti effettuati *in vitro* sulle linee cellulari hanno posto in evidenza, che le cellule derivanti da tumori mammari estrogeno dipendenti hanno una maggiore sensibilità al trattamento con la leptina. Il trattamento con l'anticorpo 9F8, che lega il recettore LepR, inibisce le funzioni svolte dalla leptina. Tale osservazione ci ha suggerito la possibilità di utilizzare l'anticorpo 9F8 anche *in vivo*.

È stato quindi effettuato un esperimento preliminare per valutare l'effetto dell'anticorpo 9F8 nel modulare la crescita tumorale *in vivo*.

I topi sono stati inoculati con 5×10^5 cellule MCF7 ed alla comparsa del tumore sono stati sottoposti al trattamento con l'anticorpo monoclonale 9F8, come descritto nelle procedure sperimentali. I dati ottenuti indicano che nei topi trattati con l'anticorpo monoclonale vi è una riduzione del volume del tumore fino al 60-70% rispetto ai topi controllo (fig.24). tale dato è puramente indicativo in quanto occorre ripetere l'esperimento prolungando nel tempo il trattamento con l'anticorpo ed utilizzando un maggior numero di animali.

I risultati ottenuti dagli esperimenti *in vitro* rafforzati da quelli ottenuti *in vivo*, seppur preliminari, suggeriscono che l'anticorpo è in grado di inibire l'azione proliferativa della leptina.

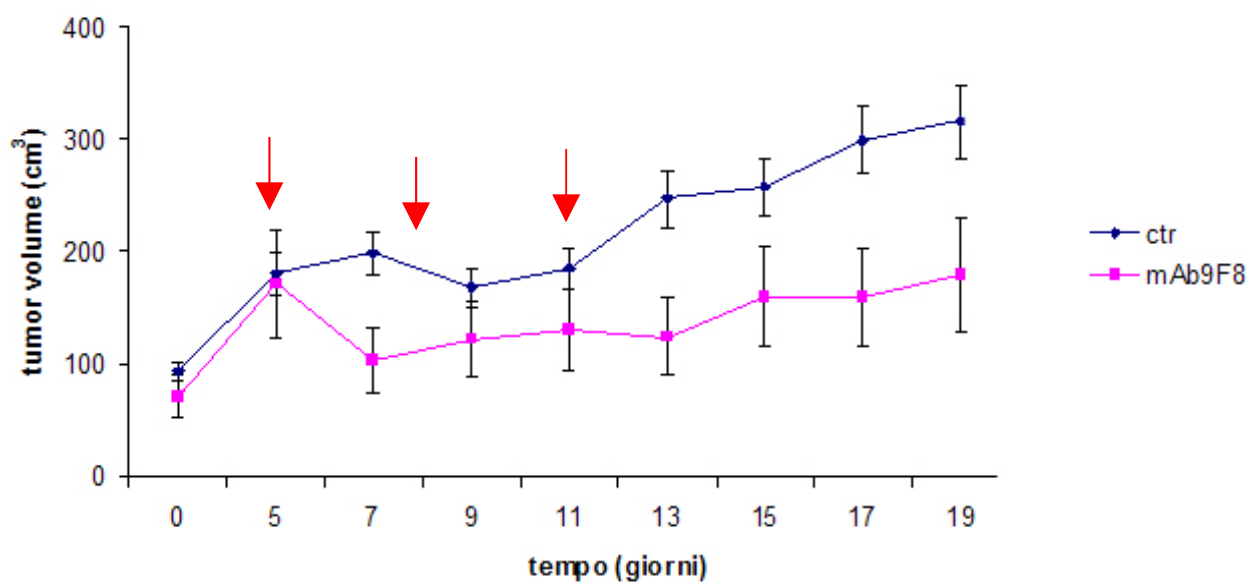


Figura 24: Grafico del volume della massa tumorale (cm³) in funzione del tempo (giorni).

Un gruppo di topi sono stati trattati con l'anticorpo monoclonale 9F8 (■). I topi controllo (◆). Gli inoculi sono stati effettuati per 3 volte ad intervalli di 72 ore (▲).

L'ESPRESSIONE DI LepR CORRELA CON LA PRESENZA DI $E\alpha$ IN**VITRO**

Analizzando l'espressione di $E\alpha$ in seguito al trattamento con la leptina (fig.25), è stato osservato che la leptina induce un aumento dell'espressione del recettore degli estrogeni nelle linee cellulari MCF7 e OVCAR3 (fig.25A); mentre nelle linee cellulari MDA-MB231 e SKBR3 non abbiamo osservato alcuna espressione (fig.25B).

Per comprendere meglio l'interrelazione tra l'espressione dei due recettori sono stati effettuati esperimenti di RNA *interference* sulle linee cellulari MCF7 e MDA-MB231.

È stato, quindi, verificato che fosse avvenuto il silenziamento del gene per il recettore della leptina, infatti, risulta evidente, che nelle cellule sottoposte al silenziamento genico, sia in presenza (linea 2) che in assenza (linea 3) di leptina, non vi è un aumento dell'espressione di LepR (fig.26A).

È sembrato, quindi, importante verificare se il silenziamento inibisse l'attivazione delle due vie di trasduzione del segnale attivate dalla leptina e quindi sono stati valutati i livelli di espressione sia delle MAPKs (fig.26B) che di STAT3 (fig.26C). È stato infine valutato l'effetto del silenziamento del gene codificante LepR sull'espressione del recettore $E\alpha$. Gli esperimenti hanno dimostrato che l'espressione di LepR è correlata a quella del recettore degli estrogeni (fig.26D), infatti l'inibizione dell'espressione di LepR induce l'inibizione dell'espressione del recettore $E\alpha$. I dati ottenuti hanno avuto una ulteriore conferma dai saggi di vitalità e proliferazione cellulare in cui si osserva che

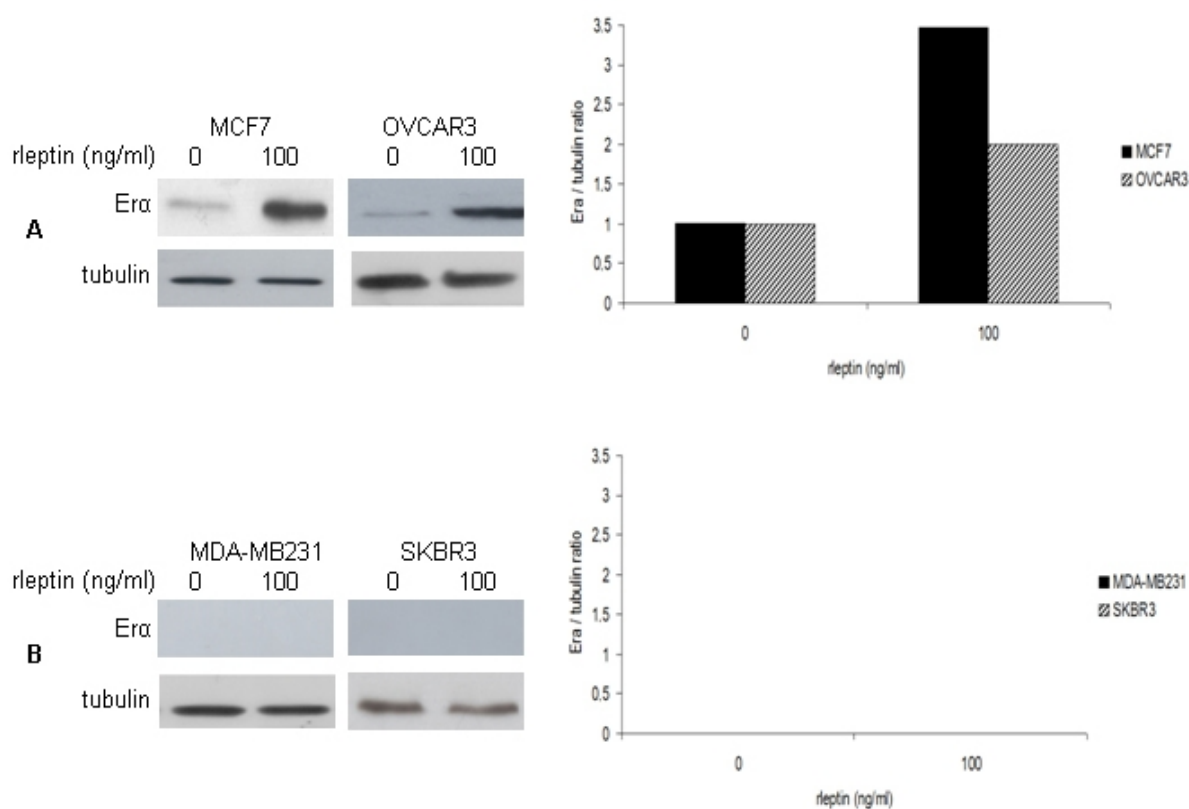


Figura 25: Analisi dei livelli di espressione di Era mediante Western blotting.

A: espressione di Era in cellule MCF7 e OVCAR3; B: espressione di Era in cellule MDA-MB231 e SKBR3. L'analisi densitometrica dell'espressione di Era è stata effettuata in rapporto all'espressione della tubulina.

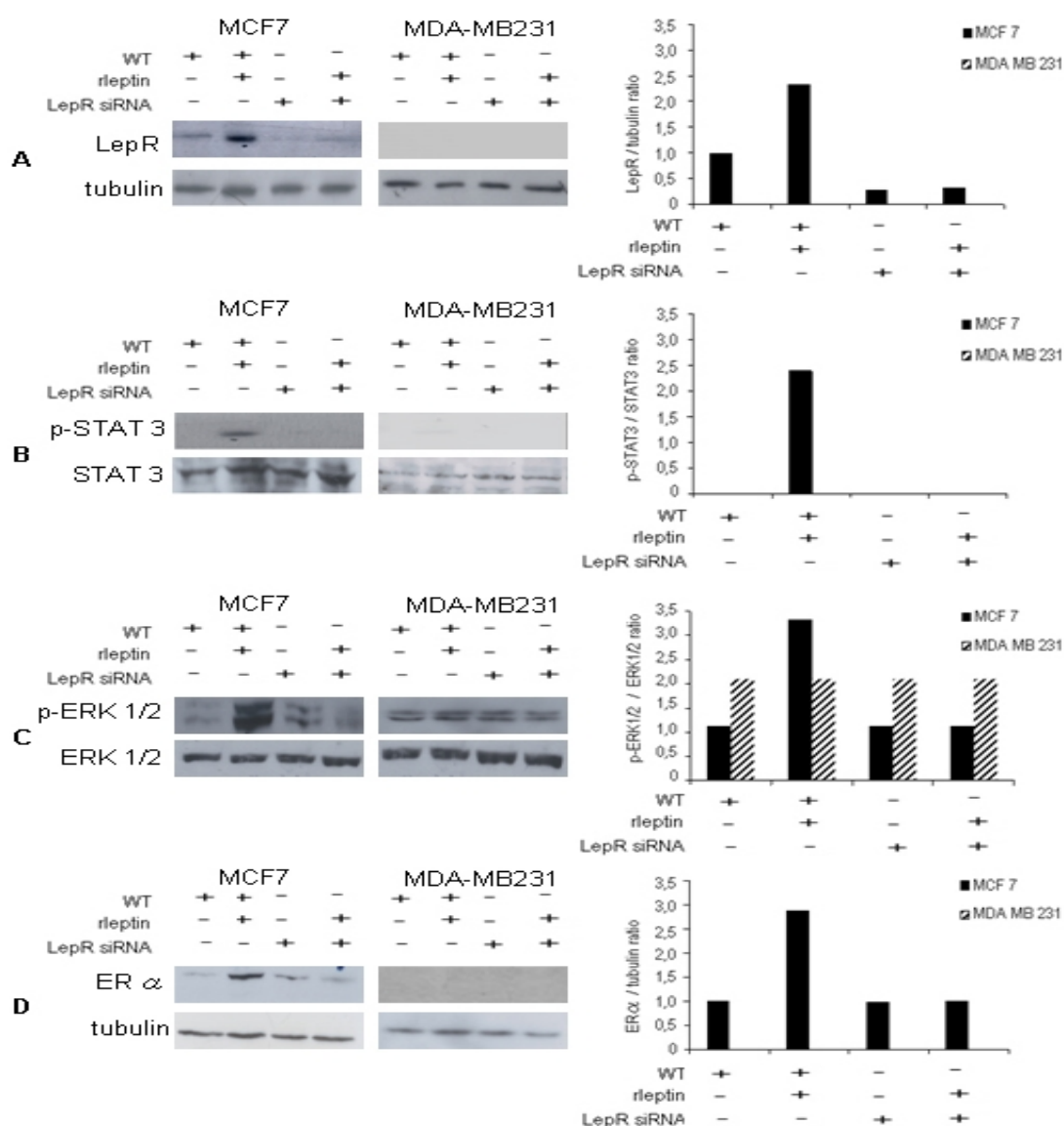


Figura 26: Analisi dei livelli di espressione di LepR (A), di p-STAT3 (B), di p-ERK1/2 (C) e di Era (D) mediante Western blotting. L'analisi densitometrica dell'espressione di LepR e di Era è stata effettuata in rapporto all'espressione della tubulina. L'analisi densitometrica dell'espressione di p-STAT3 e di p-ERK1/2 è stata effettuata in rapporto all'espressione basale di STAT3 ed ERK1/2 rispettivamente.

l'RNA *interference* neutralizza l'effetto positivo della leptina sia sulla vitalità (fig.27A) sia sulla proliferazione (fig.27B) della linea cellulare MCF7.

L'ESPRESSIONE DI LepR, IN PAZIENTI AFFETTI DA CANCRO ALLA MAMMELLA, CORRELA CON L'ESPRESSIONE DI E α

Per valutare se la correlazione tra l'espressione di LepR e quella di E α , osservata *in vitro*, fosse presente anche *in vivo*, è stata condotta un'analisi *ex-vivo* su campioni di tessuto prelevati da pazienti operati per un tumore mammario a diverso grado di malignità.

Grazie alla collaborazione con l'Istituto Nazionale dei Tumori "G. Pascale" di Napoli, sono stati analizzati 33 tumori al seno ottenuti da pazienti operati nella struttura (Tabella 1). Nelle cellule costituenti le normali unità dotto-lobulari della mammella è stata osservata un'espressione di LepR principalmente nel citoplasma (fig.28).

Un aumento statisticamente significativo ($p = 0,03$) della positività citoplasmatica dell'espressione di LepR è stata osservata in 11 dei 19 casi che presentavano un'elevata espressione di E α . È stato rivelato un valore medio di espressione di LepR del 54% nelle cellule neoplastiche con elevata espressione di E α , mentre solo 2 su 14 casi analizzati hanno mostrato un'alta espressione del recettore della leptina pur non esprimendo il recettore per gli estrogeni (tab.2 e fig.28). Una valutazione statistica dell'espressione di LepR ha mostrato una significativa associazione ($p=0,05$) tra stadio basso-intermedio (G1-G2) del tumore ed espressione di LepR (Tabella 2). Ulteriori indagini saranno effettuate per ampliare la casistica già analizzata.

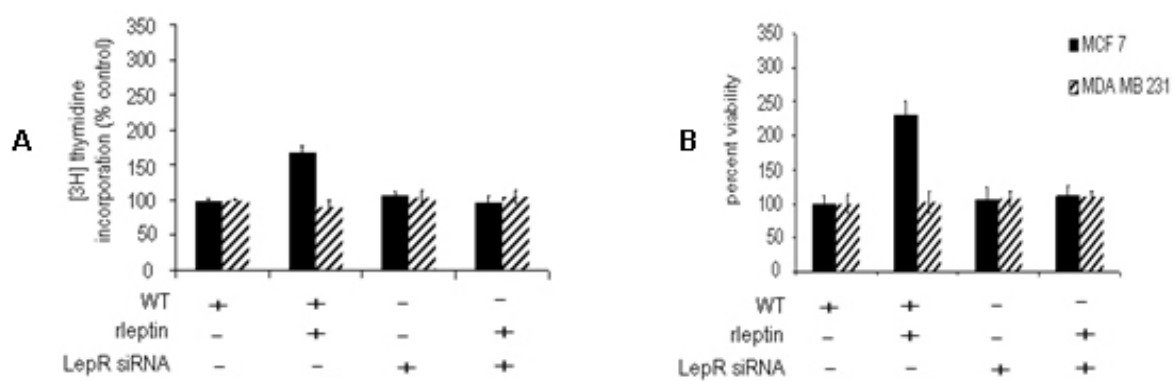


Figura 27: Analisi degli effetti del silenziamento genico di LepR sulla vitalità e la proliferazione cellulare delle cellule MCF7 e MDA-MB231.

A: Analisi della proliferazione cellulare.

B: Analisi della vitalità cellulare.

\	Age	Site	Diagnosis	Grading	Staging	Stage	Erα	LepR
1	37	R	ILC	G1	pT1pN0	I	90%	H (90%)
2	71	R	ILC	G3	pT2pN0	IIA	90%	0
3	49	R	ILC	G3	pT2pN0	IIA	80%	0
4	69	L	IDC	G3	pT2pN0	IIA	90%	0
5	53	R	IDC	G2	pT2pN0	IIA	90%	L (30%)
6	56	R	IDC	G2	pT1pN1	IIA	80%	0
7	44	R	ILC	G3	pT2pN2	IIIA	85%	L (30%)
8	71	L	IDC	G2	pT2pN0	IIA	90%	H (90%)
9	51	L	ILC	G1	pT1pN0	I	80%	H (90%)
10	65	L	IDC	G3	pT2pN3	IIIC	85%	H (90%)
11	57	L	ILC	G2	pT1pN0	I	85%	H (90%)
12	51	L	IDC	G2	pT1pN0	I	90%	L (40%)
13	87	R	IDC	G3	pT2pN1	IIB	85%	H (60%)
14	55	R	IDC	G2	pT1pN0	I	75%	H (90%)
15	26	R	IDC	G3	pT2pN2	IIIA	80%	H (90%)
16	63	R	IDC	G3	pT1pN0	I	85%	L (5%)
17	45	L	ILC	G1	pT1pN0	I	85%	H (80%)
18	73	R	IDC	G3	pT1pN0	I	90%	H (90%)
19	69	R	ILC	G2	pT1pN0	I	90%	H (60%)
20	73	L	IDC	G3	pT2pN1	IIB	0	0
21	86	L	IDC	G3	pT1pN2	IIIA	0	0
22	74	L	IDC	G3	pT2pN2	IIIA	0	H (60%)
23	56	R	IDC	G3	pT2pN0	IIA	0	0
24	43	R	ILC	G3	pT2pN0	IIA	0	L (30%)
25	50	R	IDC	G3	pT1pN1	IIA	0	0
26	41	L	IDC	G2	pT2pN0	IIA	0	L(30%)
27	56	L	IDC	G2	pT2pN0	IV	0	0
28	55	R	IDC	G3	pT1pN0	I	0	0
29	59	L	IDC	G3	pT2pN2	IIIA	0	0
30	62	L	IDC	G2	pT1pN0	I	0	L (40%)
31	55	R	IDC	G3	pT2pN3	IIIC	0	H (60%)
32	70	L	IDC	G2	pT3pN2	IIIA	0	L (5%)
33	70	R	IDC	G3	pT1pN1	IIA	0	L (30%)

R = right; **L** = left; **H** = high (more than 50%); **L** = low (less than 50%);

IDC = infiltrating ductal carcinoma; **ILC** = infiltrating lobular carcinoma;

Erα = estrogen receptor expression; **LepR** = leptin receptor expression; **M** = metastasis.

Tabella 1: Principali caratteristiche cliniche e patologiche di pazienti affetti da cancro alla mammella in relazione all'espressione di Erα e LepR.

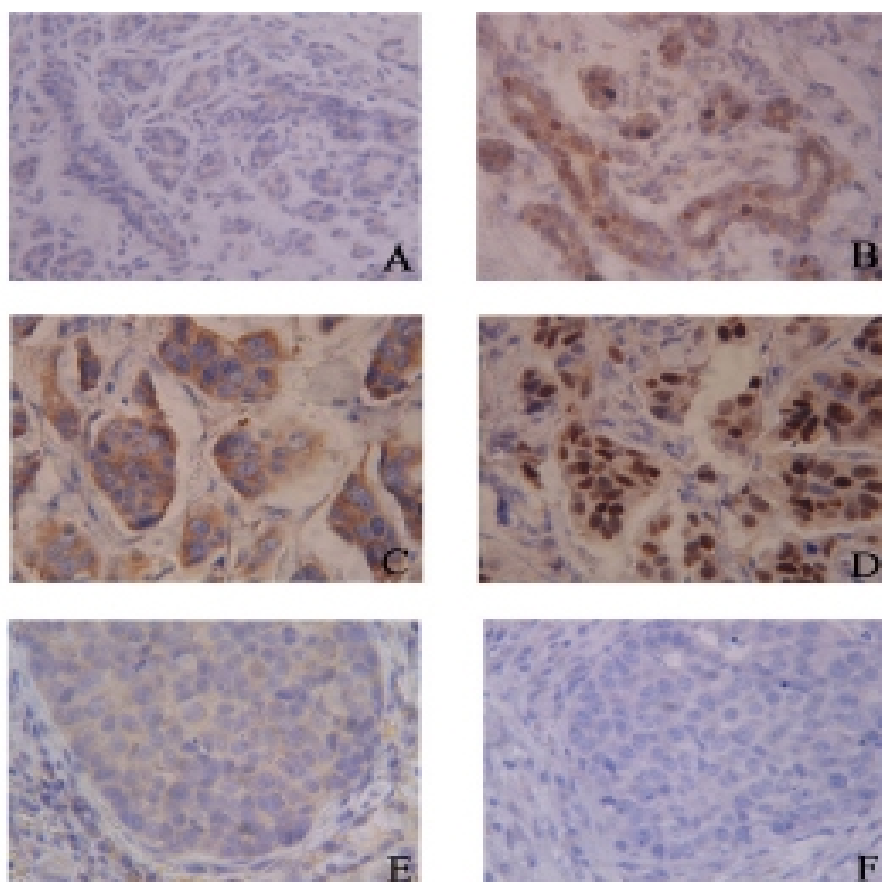


Figura 28: Analisi immunoistochimica dell'espressione di LepR e ER α , (ingrandimento microscopico 63x).

A: Espressione citoplasmatica di LepR in una unità dutto-lobulare del parenchima mammario. B: Espressione nucleare di ER α nello stesso campo. C: Espressione citoplasmatica di LepR in un carcinoma duttale infiltrante di grado intermedio. D: Espressione nucleare di ER α nello stesso campo. E: Espressione assente di LepR in un carcinoma duttale infiltrante di grado elevato. F: Assenza di espressione di ER α nello stesso campo.

		High LepR expression 13 cases	Low/absent LepR expression 20 cases	<i>p value</i>
Histotype	ILC	38.5% (5)	20.0% (4)	NS
	IDC	61.5% (8)	80.0% (16)	
Grading	G1	23.1% (3)	0.0% (0)	0.05
	G2	30.8% (4)	35.0% (7)	
	G3	46.1% (6)	65.0% (13)	
Stage	I	54.0% (7)	20.0% (4)	NS
	II	7.7% (1)	55.0% (11)	
	III	38.5% (5)	20.0% (4)	
	IV	0.0% (0)	5.0% (1)	
Era expression				
	High	84.6% (11)	40.0% (8)	0.03
	Low/absent	15.4% (2)	60.0% (12)	

LepR = Leptin Receptor; Era = Estrogen Receptor α ; ILC = Infiltrating Lobular Carcinoma;

IDC = Infiltrating Ductal Carcinoma; NS = Not Significant

Tabella 2: Analisi statistica dei livelli di espressione di LepR in relazione ai principali dati clinici e patologici.

Discussione e Conclusioni

La relazione esistente tra l'obesità e l'insorgenza di alcune forme di neoplasie è nota da diverso tempo (Bray et al., 2002), per cui la scoperta successiva che gli adipociti possano svolgere un ruolo nella carcinogenesi non ha suscitato molta sorpresa (Housa et al., 2006). Numerosi modelli sperimentali suggeriscono che la leptina, l'ormone principale prodotto dal tessuto adiposo, possa essere coinvolto nella patogenesi e nella progressione di alcune forme tumorali, fra cui il cancro alla mammella, alle ovaie e alla prostata (Mistry et al., 2007; Carroll et al., 1998). Tuttavia, il potenziale ruolo dell'asse leptina /LepR nella patogenesi di queste forme neoplastiche non è stato ancora completamente chiarito così come il rapporto diretto esistente tra espressione del LepR e ER α nel tumore mammario è ancora irrisolto.

Inoltre il ruolo svolto dall'obesità nel modulare il tumore prostatico è ancora molto controverso. Mentre alcuni studi hanno suggerito che l'obesità è anche un fattore di rischio per l'insorgenza del cancro alla prostata (Von Hafe et al., 2004) altri, più recentemente, invece, hanno dimostrato (Deo et al., 2008) che essa influenza soprattutto la progressione di tale forma di tumore nonché la sua evoluzione verso una forma più aggressiva mentre, contemporaneamente, potrebbe ridurre l'insorgenza di una forma meno aggressiva (Freedland et al., 2007). Pertanto, è possibile che, invece di aumentare il rischio assoluto di sviluppare il cancro alla prostata, l'obesità possa essere associata alla progressione di tumori latenti in forme clinicamente più aggressive o metastatiche (Mistry et al., 2008).

Il ruolo svolto dal testosterone e dagli androgeni nel regolare le affezioni della prostata è ben conosciuto, tuttavia, gli androgeni mostrano una complessa e contraddittoria

relazione con l'obesità. La quantità di testosterone circolante, infatti, diminuisce in relazione all'età di un uomo, sia in individui sani sia in individui obesi (Pasquali et al., 1995). Altri studi hanno suggerito che il testosterone possa esercitare un effetto sulla differenziazione del cancro alla prostata: bassi livelli di testosterone sono stati associati ad una bassa differenziazione del tumore (Massengill et al., 2003; Schatzl et al., 2001).

L'obesità, quindi, sembra fornire un ambiente in cui le cellule neoplastiche possano diventare non androgeno responsive e il tumore alla prostata possa essere più aggressivo (Freedland et al., 2007). Studi *in vitro* suggeriscono, inoltre, un presunto ruolo svolto dalla leptina nel favorire la carcinogenesi nella prostata (Deo et al., 2008). Il ruolo degli androgeni nell'insorgenza, nella progressione e nella disseminazione metastatica, è, quindi, ancora oggetto di controversia ed approfondimento.

Le linee cellulari derivanti da tumori alla prostata, da me prese in esame, mostrano effetti diversi nell'interazione con la leptina; infatti, in entrambe le linee cellulari è stato osservata l'attivazione di STAT3, ma solo nelle cellule LNCaP, quella delle MAPK.

L'attivazione delle due vie di trasduzione del segnale non induce, però, nelle cellule androgeno responsive, LNCaP, un aumento della vitalità e della proliferazione cellulare, fenomeno che invece avviene nelle cellule non androgeno responsive. Quindi nella linea cellulare LNCaP la leptina pur attivando LepR e le vie di trasmissione del messaggio MAPK e STAT3, non determina l'attivazione della vitalità e proliferazione cellulare.

L'anticorpo monoclonale 9F8, come atteso inibisce la vitalità e la proliferazione delle cellule Du145 e non mostra alcun effetto sulle cellule LNCaP. Tali dati contrastanti,

sono in accordo però con alcuni dati presenti in letteratura (Frankenberry et al., 2004) e necessitano di ulteriori approfondimenti e delucidazioni.

Tali risultati, tuttavia, ci spingono ad ipotizzare che l'anticorpo 9F8 possa rappresentare un valido strumento non solo nella comprensione del ruolo della leptina nell'insorgenza e nella progressione del cancro alla prostata ma potrebbe anche essere utilizzato, in seguito ad ulteriori studi chiarificatori, come possibile coadiuvante nelle terapie attuali contro questa forma di cancro.

Nelle linee cellulari, MCF7 e OVCAR3, derivanti invece da tumori estrogeno dipendenti, la leptina induce l'aumento dell'espressione sia di LepR che di ER α nonché l'attivazione sia della via di trasduzione del segnale delle MAPK sia di quella di STAT3.

Tale attivazione si traduce in un aumento della vitalità e della proliferazione cellulare, suggerendo, quindi, una forte correlazione tra l'espressione di LepR e di ER α .

L'utilizzo dell'anticorpo monoclonale 9F8, capace di neutralizzare LepR, e quindi di interferire sull'espressione di ER α , ha posto in evidenza che la leptina può svolgere le sue funzioni solo attraverso l'interazione con il suo recettore.

È noto che la quantità di leptina circolante è presente in concentrazioni differenti fra le donne e gli uomini ed influenza la produzione degli estrogeni (Ahima et al., 2000). Inoltre gli estrogeni, come la leptina, possono ridurre l'appetito e l'accumulo di adipe in soggetti sani. Recentemente, è stato dimostrato che l'estradiolo può indurre la riduzione del peso corporeo e l'assunzione di cibo attraverso l'attivazione di STAT3 (Gao et al., 2007). Inoltre solo recentemente è stato osservato che la leptina e gli estrogeni mostrano

simili proprietà pro-infiammatorie che, come noto, possono contribuire all'induzione e alla progressione dei tumori (Alexander et al., 2009). Queste osservazioni rafforzano l'idea dell'esistenza di un generale *cross-talk* tra leptina ed estrogeni, infatti, esiste una sovrapposizione dei loro effetti sia in termini molecolari sia in ambito metabolico.

I dati ottenuti *in vitro* sull'attivazione leptina dipendente delle vie di trasduzione del segnale, ci hanno suggerito di valutare se l'anticorpo 9F8 potesse agire anche *in vivo*. La riduzione dei tumori in topi, inoculati, in precedenza, con cellule MCF7 e trattati con l'anticorpo, ha indicato che l'mAb9F8 potrebbe rappresentare la base per un nuovo approccio terapeutico per la cura di alcune forme di cancro della mammella, anche se ulteriori esperimenti sono necessari sia per ottimizzare il sistema usato, sia per valutare i meccanismi coinvolti.

Per valutare, a livello molecolare, se l'espressione di LepR potesse essere dipendente dalla sensibilità agli estrogeni nelle cellule di tumore alla mammella, è stato effettuato il silenziamento genico di LepR. I dati ottenuti hanno confermato l'esistenza di una relazione diretta tra l'espressione di LepR e quella di ER α nella linea cellulare MCF7.

I dati riguardanti la neutralizzazione di LepR sia attraverso l'utilizzo del mAb9F8 sia mediante il silenziamento genico, indicano l'importanza della leptina nel regolare la crescita, la proliferazione e la vitalità delle cellule del cancro alla mammella. Questa ulteriore evidenza rafforza la convinzione che la riduzione del peso corporeo in soggetti sani, riducendo la concentrazione di leptina, potrebbe essere efficace nel prevenire l'insorgenza e la progressione di diverse forme di cancro, soprattutto quella del tumore

alla mammella e quindi la riduzione dei livelli di leptina nei soggetti affetti da tumore mammario estrogeno responsivo potrebbe, essere utilizzato anche come coadiuvante nella terapia del cancro alla mammella.

I dati ottenuti *in vitro* ed *in vivo* sono stati corroborati dall'analisi *ex-vivo* di tumori alla mammella umani di in cui è stato dimostrato che l'espressione di ER α correla con l'espressione di LepR. È stata osservata, infatti, una forte correlazione tra la positività ad ER α ed un elevata espressione di LepR. Al contrario, nella maggior parte dei pazienti ER α negativi non sono stati osservati livelli significativi di espressione di LepR.

L'interpretazione di questi dati ci suggerisce che LepR non solo potrebbe essere considerato come un indicatore dello stato di differenziazione del cancro alla mammella ma esso, dato lo stretto rapporto esistente con l'espressione di ER α , potrebbe essere l'obiettivo di nuovi approcci terapeutici validi ad utilizzare il loro silenziamento come possibili validi marcatori negli studi clinici riguardanti il tumore alla mammella estrogeno positivo. L'anticorpo 9F8 specifico nel bloccare la funzionalità di LepR potrebbe essere quindi impiegato come potenziale nuovo farmaco antineoplastico anche nei tumori alla mammella estrogeno responsivi.

Bibliografia

Aggarwal B.B., Kunnumakkara A.B., Harikumar K.B., Gupta S.R., Tharakan S.T., Koca C., Dey S. and Sung B.

“Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?”

Ann N Y Acad Sci. (2009) **1171**,59-76

Ahima R.S. and Flier J.S.

“Leptin”

Annu Rev Physiol (2000) **62**,413-437

Ahima R.S. and Flier J.S.

“Adipose tissue as an endocrine organ”

Trends Endocrinol Metab (2000) **11**,327-332

Alexander C., Cochran C.J., Gallicchio L., Miller S.R., Flaws J.A. and Zacur H.

“Serum leptin levels, hormone levels, and hot flashes in midlife women”

Fertil Steril. (2009) **22**, 1120-1130

Banks W.A.

“The many lives of leptin”

Peptides (2004) **25**, 331-338

Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., Bortoluzzi, M. N., Moizo L., Lehy T., Guerre-Millo M., Le Marchand-Brustel Y. and Lewin M.J.

”The stomach is a source of leptin”

Nature (1998) **6695**,790-3

Bahrenberg G., Behrmann I., Barthel A., Hekerman P., Heinrich P.C., Joost H.G. and Becker W.

“Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers”

Mol Endocrinol (2002) **16**,859-872

Baillargeon J., Platz E.A. and Rose D. P.

“Obesity, adipokines and prostate cancer in a prospective population based study”

Cancer Epidem Biomarkers and Prevention (2006) **15**, 1331-1335

- Baratta M.
“Leptin – from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues”
Med. Sci. Monit. (2002) **8**, RA282–RA292
- Bazan J.F.
“Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily”
Proc. Natl. Acad. Sci. (1990) **87**, 6934–6938
- Baumann H., Morella K.K., White D.W., Dembski M., Bailon P.S., Kim H., Lai C.F. and Tartaglia L.A.
“The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors”
Proc Natl Acad Sci (1996) **93**, 8374–8378
- Bjorbaek C., Uotani S., da Silva B. and Flier J.S.
“Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor”
J Biol Chem (1997) **272**, 32686–695
- Bjorbaek C., Buchholz R.M., Davis S.M., Bates S.H., Pierroz D.D., Gu H., Neel B.G., Myers M.G. Jr and Flier J.S.
“Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors”
J Biol. Chem. (2001) **7**, 4747–4755
- Bjørbaeck C. and Kahn B.B.
“Leptin signaling in the central nervous system and the periphery”
Rec. Prog. Horm. Res (2004) **59**, 305–331
- Bray G.A.
“The underlying basis for obesity: relationship to cancer”
J Nutr. (2002) **132**, 3451S–3455S
- Blum W.F., Englaro P., Hanitsch S., Juul A., Hertel N.T., Müller J., Skakkebaek N.E., Heiman M.L., Birkett M., Attanasio A.M., Kiess W. and Rascher W.
“Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone “
J Clin Endocrinol Metab. (1997) **82**, 2904–10
- Calle E.E. and Thun M.J.
“Obesity and cancer”
Oncogene (2004) **38**, 365–6378
- Carroll K.K.
“Obesity as a risk factor for certain types of cancer”

Lipids (1998) **11**,1055-9

Castracane V.D., Kraemer R.R., Franken M.A., Kraemer G.R. and Gimpel T.
“Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration”
Fertil Steril. (1998) **70**,472-7

Catalano S., Marsico S., Giordano C., Mauro L., Rizza P., Panno M.L. and Ando S.
“Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line”
J Biol Chem (2003) **278**, 28668–28676

Chan J.L. and Mantzoros C.S.
“Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhea and anorexia nervosa”
Lancet (2005) **366**, 74-85

Chlebowski R.T., Aiello E. and McTiernan A.
“Weight loss in breast cancer patient management”
J Clin Oncol (2002) **20**,1128–1143

Choi K.M., Barash I. and Rhoads R.E.
” Insulin and prolactin synergistically stimulate beta-casein messenger ribonucleic acid translation by cytoplasmic polyadenylation”
Mol Endocrinol (2004) **18**,1670-1686

Cioffi J.A., Shafer A.W., Zupancic T.J., Smith-Gbur J., Mikhail A., Platika D. and Snodgrass H. R.
“Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction”
Nat. Med. (1996) **2**, 585-589

Cirillo D., Rachiglio A.M., La Montagna R., Giordano A. and Normanno N.
“Leptin signalling in breast cancer: an overview”
Journal of Cellular Biochemistry (2008) **105**,956-964

Cleary M.P. and Maihle N.J.
”The role of body mass index in the relative risk of developing premenopausal versus postmenopausal breast cancer”
Proc Soc Exp Biol Med (1997) **216**,28–43

- Cleary M.P., Phillips F.C., Getzin S.C., Jacobson T.L., Jacobson M.K., Christensen T.A., Juneja S.C., Grande J.P. and Maihle N.J.
“Genetically obese MMTV-TGF-alpha/Lep(ob)Lep(ob) female mice do not develop mammary tumors”
Breast Cancer Res Treat (2003) **77**, 205–215
- Cohen S.L., Halaas J.L., Friedman J.M., Chait B.T., Bennett L., Chang D., Hecht R. and Collins F.
“Human leptin characterization”
Nature (1996) **3**, 582:589
- Cooper D.R. and Yasuda K.
“Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: Reciprocal involvement of PKC-alpha and PPAR expression”
Biochim Biophys Acta (2002) **1592**, 107–116
- Dennis K.E.
“Postmenopausal women and the health consequences of obesity”
J Obstet Gynecol Neonatal Nurs. (2007) **36**, 511 -9
- Deo D.D., Rao A.P., Bose S.S., Ouhtit A., Baliga B.S., Rao S.A., Trock B.J., Thouta R., Raj M.H.G. and Rao P.N.
“Differential effects of leptin on the invasive potential of androgen-dependent and – independent prostate carcinoma cells ”
J. Biomed. And Biotechnol. **10**, 163902-163910
- Devos R., Guisez Y., Van der Heyden J., White D.W., Kalai M., Fountoulakis M. and Plaetinck G.
“Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding”
J Biol Chem (1997) **272**, 18304-18310
- Dieudonne M.N., Machinal-Quelin F., Serazin-Leroy V., Leneveu M.C., Pecquery R. and Giudicelli Y.
“Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells”
Biochem Biophys Res Commun (2002) **293**, 622–628
- Enger S.M., Ross R.K., Paganini-Hill A., Carpenter C.L. and Bernstein L.
“Body size, physical activity, and breast cancer hormone receptor status: Results from two case-control studies”
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev (2000) **9**, 681–687

- Farooqi IS, O'Rahilly S.
"Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis"
Am J Clin Nutr. (2009) **89**, 980S-984S
- Fazeli M., Esfahani H.Z., Wu Z., Maamra M., Bidlingmaier M., Pockley A. G., Watson P., Matarese G., Strasburg C.J. and Ross R.J.M.
"Identification of a monoclonal antibody against the leptin receptor that acts as an antagonist and blocks human monocyte and T cell activation"
J Immunol Methods. (2006) **312**, 190-200
- Finn R.S., Dering J., Conklin D., Kalous O., Cohen D.J., Desai A., Ginther C., Atefi M., Chen I., Fowst C., Los G. and Slamon D.J.
"PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro"
Breast Cancer Res. (2009) **29**,R75-R77
- Frankenberry K.A., Somasundar P., McFadden DW. and Vona-Davis L.C.
"Leptin induces cell migration and the expression of growth factors in human prostate cancer cells"
Am J Surg (2004) **188**,560–565
- Freedland S.J. and Platz E.A.
"Obesity and prostate cancer: making sense out of apparently conflicting data"
Epidemiol Rev. (2007) **29**, 88-97
- Freedland S.J.
"Obesity and prostate cancer: importance of race and stage of disease"
J Urol. (2007) **178**,1842-3
- Friedman J.M., Leibel R.L., Siegel D.S., Walsh J. and Bahary N.
"Molecular mapping of the mouse ob mutation"
Genomics (1991) **11**,1054-1062
- Friedman J.M. and Halaas J.L.
"Leptin and the regulation of body weight in mammals"
Nature (1998) **395**,763-770
- Frühbeck G., Jebb S. A. and Prentice A. M.
"Leptin: physiology and pathophysiology"

Clin. Physiol. (1998) **18**, 399–419

Frühbeck G.

“A heliocentric view of leptin”

Proc. Nutr. Soc. (2001) **60**, 301-308

Frühbeck G.

“Peripheral actions of leptin and its involvement in disease”

Nutr. Rev. (2002) **60**, S47-S55

Gainsford T., Willson T.A., Metcalf D., Handman E., McFarlane C., Ng A., Nicola N.A., Alexander W.S. and Hilton D.J.,

“Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells”

Proc Natl Acad Sci (1996) **10**, 14564-14568

Gao Q., Mezei G., Nie Y., Rao Y., Choi C.S., Bechmann I., Leranth C., Toran-Allerand D., Priest C.A., Roberts J.L., Gao X.B., Mobbs C., Shulman G.I., Diano S and Horvath T.L.

“Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals”

Nat Med. (2007) **13**, 89-94

Garofalo C., Sisci D. and Surmacz E.

“Leptin interferes with the effects of the antiestrogen ICI 182,780 in MCF-7 breast cancer cells”

Clin Cancer Res (2004) **10**, 6466–6475

Garofalo C., Koda M., Cascio S, Sulkowska M., Kanczuga-Koda L., Golaszewska J., Russo A., Sulkowski S. and Surmacz E.

”Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli”

Clin Cancer Res (2006) **12**, 447-53

Ghilardi N. and Skoda R.C.

“The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line”

Mol Endocrinol (1997) **11**, 393-399

Greiser S., Ledet T., Moller N., Jorgensen J.O., Christiansen J.S., Petersen K. and Ovesen P.

- “Effect of leptin on basal and FSH stimulated steroidogenesis in human granulosa luteal cells”
Acta Obstet Gynecol Scand (2000) **79**, 931-935
- Halaas J. L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S. L., Chait B. T., Rabinowitz D., Lalone R.L. Burley S.K. and Friedman J.M.
“Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene”
Science (1995) **269**, 543-546
- Hegyi K., Fülöp K., Kovács K., Tóth S. and Falus, A.
“Leptin-induced signal transduction pathways”
Cell Biol. Int. (2004) **28**, 159–169
- Hileman S.M., Tornøe J., Flier J.S. and Bjorbaek C.
“Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells”
Endocrinology (2000) **141**, 1955–1961
- Hill M.J.
“Diet, physical activity and cancer risk”
Public Health Nutr. (1999) **2**, 397-401
- Hong S.C., Yoo S.W., Cho G.J., Kim T., Hur J.Y., Park Y.K., Lee K.W. and Kim S.H.
“Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women “
Menopause. (2007) **14**, 835-40
- Horn R., Geldszus R., Potter E., Zon Zur Muhlen A. and Brabant G.
“Radioimmunoassay for the detection of leptin in human serum”
Exp Clin Endocrinol Diabetes (1996) **104**, 454-458
- Housa D., Housová J., Vernerová Z. and Haluzík M.
“Adipocytokines and cancer”
Physiol Res. (2006) **55**, 233-44
- Houseknecht K.L, Mantzoros C.S., Kuliawat R., Hadro E., Flier J.S. and Kahn B.B.
“Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity”
Diabetes (1996) **45**, 1638-1643

- Hu X., Juneja S.C., Maihle N.J. and Cleary M.P.
“Leptin: A growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development”
J Natl Cancer Inst (2002) **94**,1704–1711
- Huang W.Y., Newman B., Millikan R.C., Schell M.J., Hulka B.S. and Moorman P.G.
“Hormone-related factors and risk of breast cancer in relation to estrogen receptor and progesterone receptor status”
Am J Epidemiol (2000) **151**,703–714
- James P.T., Rigby N. and Leach R.
“The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies”
European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (2004) **11**, 3-8
- Keesey R.E. and Hirvonen M.D.
“Body weight set-points: determination and adjustment”
J Nutr (1997) **127**,1875S-1883S
- Koda M., Sulkowska M., Kanczuga-Koda L., Cascio S., Colucci G., Russo A., Surmacz E. and Sulkowski S.
“Expression of the obesity hormone leptin and its receptor correlates with hypoxia-inducible factor-1 alpha in human colorectal cancer”
Ann Oncol. (2007) **18**, 116-119
- Kopelman P.G.
“Obesity as a medical problem”
Nature (2000) **404**,635-643
- Kuczmarski R.J., Flegal K.M., Campbell S.M. and Johnson C.L.
“Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991”
JAMA. (1994) **272**,205-11
- La Cava A. and Matarese G.
“The weight of leptin in immunity”
Nat. Rev. Immunol. (2004) **4**, 371–379
- Lammert A., Kiess W., Bottner A., Glasow A. and Kratzsch, J.
“Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood”
Biochem. Biophys. Res. Commun. (2001) **283**, 982–988

- Laud K., Gourdou I., Pessemesse L., Peyrat J.P., Djiane J.
“Identification of leptin receptors in human breast cancer: Functional activity in the T47-D breast cancer cell line”
Mol Cell Endocrinol (2002) **188**, 219–226
- Lautenbach A., Budde A., Wrann C.D., Teichmann B., Vieten G., Karl T. and Nave H.
“Obesity and the associated mediators leptin, estrogen and IGF-I enhance the cell proliferation and early tumorigenesis of breast cancer cells”
Nutr Cancer. (2009) **61**,484-91
- Lavens D., Piessevaux J. And Tavernier J.
“Review: negative regulation of leptin receptor signalling”
Eur. Cytokine Netw. (2006) **3**, 211-219
- Löllmann B., Grüninger S., Stricker-Krongrad A. and Chiesi M.
“Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and e in different mouse tissues”
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1997) **238**, 648–652
- Lord G.M., Matarese G., Howard J.K., Baker R.J., Bloom S.R. and Lechler R.I.
“Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression”
Nature. (1998) **394**,897-901
- Madej T., Boguski M.S. and Bryant S.H.
“Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine”
FEBS Lett. (1995) **373**, 13–18
- Maffei M., Halaas J., Ravussin E., Pratley R.E., Lee G.H., Zhang Y., Fei H., Kim S., Lallone R. and Ranganathan S.
“Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects”
Nat Med (1995) **1**,1155-1161
- Maffei M., Fei H., Lee GH., Dani C., Leroy P., Zhang Y., Proenca R., Negrel R., Ailhaud G, Friedman J.M.
“Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus”
Proc Natl Acad Sci (1995) **92**,6957-6960

Massengill J.C., Sun L., Moul J.W., Wu H., McLeod D.G., Amling C., Lance R., Foley J, Sexton W., Kusuda L., Chung A., Soderdahl D. and Donahue T.

“Pretreatment total testosterone level predicts pathological stage in patients with localized prostate cancer treated with radical prostatectomy”

J Urol. (2003) **169**,1670-5

Masuzaki H., Ogawa Y., Isse N., Satoh N., Okazaki T., Shigemoto M., Mori K., Tamura N., Hosoda K. and Yoshimasa Y.

“Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue”

Diabetes (1995) **44**,855-858

Masuzaki H., Ogawa Y., Sagawa N., Hosoda K., Matsumoto T., Mise H., Nishimura H., Yoshimasa Y., Tanaka I., Mori T. and Nakao K.

“Nanodipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans”

Nat. Med. (1997) **9**, 1029-1033

Mazo E.B. and Lopyrev A.I.

“Obesity and prostatic cancer”

Urologia (2009) **2**,88-92

Mistry T., Digby J.E., Desai K.M. and Randeva H.S.

“Obesity and prostate cancer: a role for adipokines”

Eur Urol. (2007) **52**,46-53

Mistry T., Digby J.E., Desai K.M. and Randeva H.S.

“Leptin and adiponectin interact in the regulation of prostate cancer cell growth via modulation of p53 and bcl-2 expression”

BJU Int. (2008) **101**,1317-22

Moitra J., Mason M.M., Olive M., Krylov D., Gavrilova O., Marcus-Samuels B., Feigenbaum L., Lee E., Aoyama T., Eckhaus M., Reitman M.L. and Vinson C.

“Life without white fat: a transgenic mouse”

Genes Dev. (1998) **20**,168-81

Moizo L., Lehy, T., Guerre-Millo M., Le Marchand-Brustel Y. and Lewin M. J.

“The stomach is a source of leptin”

Nature (1998) **394**, 790–793

Morash B., Li A., Murphy P.R., Wilkinson M. and Ur E.

“Leptin gene expression in the brain and pituitary gland”

Endocrinology (1999) **140**, 5995–5998

Neville M.C., McFadden T.B. and Forsyth I.

”Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion”

J Mammary Gland Biol Neoplasia (2002) **7**, 49–66

O’Brien S.N., Welter B.H. and Price T.M.

“Presence of leptin in breast cell lines and breast tumors”

Biochem Biophys Res Commun (1999) **259**, 695–698

Okumura M., Yamamoto M., Sakuma H., Kojima T., Maruyama T., Jamali M., Cooper D.R. and Yasuda K.

“Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: Reciprocal involvement of PKC- α and PPAR expression”

Biochim Biophys Acta (2002) **2**, 695–698

Onuma M., Bub J.D., Rummel T.L. and Iwamoto Y.

“Prostate cancer cell-adipocyte interaction: Leptin mediates androgen-independent prostate cancer cell proliferation through c-Jun NH₂-terminal kinase”

J Biol Chem (2003) **278**, 42660–42667

Pasquali R., Casimirri F., De Iasio R., Mesini P., Boschi S., Chierici R., Flaminia R., Biscotti M. and Vicennati V.

“Insulin regulates testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations in adult normal weight and obese men”

J Clin Endocrinol Metab. (1995) **2**, 654–8

Perrier S., Caldefie-Ch  zet F. and Vasson M.P.

“IL-1 family in breast cancer: potential interplay with leptin and other adipocytokines”

FEBS Lett. (2009) **583**, 259–65

Potter J.D., Cerhan J.R., Sellers T.A., McGovern P.G., Drinkard C., Kushi L.R. and Folsom A.R.

“Progesterone and estrogen receptors and mammary neoplasia in the Iowa Women’s Health Study: How many kinds of breast cancer are there?”

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev (1995) **4**, 319–326

- Prolo P., Wong M. and Licinio J.
“Leptin”
Int. J. Biochem. Cell Biol. (1998) **30**, 1285–1290
- Ravussin E.
“Cellular sensors of feast and famine”
J. Clin. Invest. (2002) **109**, 1537-1540
- Rose D.P., Gilhooly E.M., Nixon D.W.
“Adverse effects of obesity on breast cancer prognosis, and the biological actions of leptin”
Int J Oncol (2002) **21**, 1285–1292
- Sahu A.
“Leptin signalling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance”
Front. Neuroendocrinol. (2004) **24**, 225-253
- Schatzl G., Madersbacher S., Thurridl T., Waldmüller J., Kramer G., Haitel A. and Marberger M.
“High-grade prostate cancer is associated with low serum testosterone levels”
Prostate. (2001) **1**, 52-8
- Sierra-Honigsmann M.R., Nath A.K., Murakami C., Garcia-Cardena G., Papapetropoulos A., Sessa W.C., Madge L.A., Schechner J.S., Schwabb M.B., Polverini P.J. and Flores-Riveros J.R.
“Biological action of leptin as an angiogenic factor”
Science (1998) **281**, 1683-1686
- Smith-Kirwin S.M., O’Connor D.M., De Johnston J., Lancey E.D., Hassink S.G. and Funanage V.L.
“Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk”
J Clin Endocrinol Metab (1998) **83**, 1810–1813
- Somasundar P., McFadden D.W., Hileman S.M. and Vona-Davis L.
“Leptin is a growth factor in cancer”
J. Surg. Res. (2004) **116**, 337-349
- Sonnenschein E., Toniolo P., Terry M.B., Bruning P.F., Kato I., Koenig K.L. and Shore R.E.
“Body fat distribution and obesity in pre- and postmenopausal breast cancer”

Int J Epidemiol. (1999) **28**,1026-31

Spiegelman B.M. and Flier J.S.
“Obesity and the regulation of energy balance”
Cell. (2001) **23**,531-43

Stattin P., Soderberg S., Hallmans G., Bylund A., Kaaks R., Stenman U.H., Bergh A. and Olsson T.
“Leptin is associated with increased prostate cancer risk: A nested case-referent study”
J Clin Endocrinol Metab (2001) **86**,1341–1345

Stephenson G.D. and Rose D.P.
“Breast cancer and obesity: An update”
Nutr Cancer (2003) **45** ,1–16

Tartaglia L.A., Dambski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richard G.J., Campfield L.A., Cark F.T. and Deeds J.
“Identification and expression cloning of leptin receptor, OB-R”
Cell (1995) **83**, 1263-1271

Tungtrongchitr R., Pongpaew P., Phonrat B., Tribunyatkul S., Viroonudomphol D., Supawan V., Jintaridhi P., Lertchavanakul A., Vudhivai N. and Schelp F.P.
“Leptin concentration in relation to body mass index (BMI) and hematological measurements in Thai obese and overweight subjects”
Southeast Asian J Trop Med Public Health. (2000) **31**,787-94

Uddin S., Bu R., Ahmed M., Abubaker J., Al-Dayel F., Bavi P. and Al-Kuraya K.S.
“Overexpression of leptin receptor predicts an unfavorable outcome in Middle Eastern ovarian cancer”
Mol Cancer. (2009) **18**,74-88

Unger R.H.
“The hyperleptinemia of obesity-regulator of caloric surpluses”
Cell (2004) **117**, 145-151

Unger R.H.
“The hyperleptinemia of obesity – regulator of caloric surpluses”
Cell (2004) **117**, 145–151

- Vona-Davis L. and Rose D.P.
“Angiogenesis, adipokines and breast cancer”
Cytokine Growth Factor Rev. (2009) **20**,193-201
- Von Hafe P., Pina F., Pérez A., Tavares M. and Barros H.
“Visceral fat accumulation as a risk factor for prostate cancer”
Obes Res. (2004) **12**, 1930-1935
- Wang J., Liu R., Hawski M., Barzilai N. and Rossetti L.
“A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat”
Nature (1998) **393**, 684-688
- Weigle D.S.
“Appetite and the regulation of body composition”
Faseb J (1994) **8**,302-310
- Weigle D.S., Bukowski T.R., Foster D.C., Holderman S., Kramer J.M., Lasser G., Lofton-Day C.E., Prunkard D.E., Raymond C. and Kuijper J.L.
“Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse”
J Clin Invest. (1995) **4**, 2065-70
- Wilkinson M., Morash B. and Ur E.
“The brain is a source of leptin”
Front Horm Res. (2000) **26**,106-25
- Zabeau L., Lavens D., Peelman F., Eyckerman S., Vandekerckhove J. and Tavernier J.
“The ins and outs of leptin receptor activation”
FEBS Lett (2003) **546**,45–50
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L. and Friedman J.M.
“Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue”
Nature (1994) **372**,425–432
- Zhang F., Basinski M.B., Beals J.M., Briggs S.L., Churgay L.M., Clawson D.K., DiMarchi R.D., Furman T.C., Hale J.E., Hsiung H.M., Schoner B.E., Smith D.P., Zhang X.Y., Wery J.P. and Schevitz R.W.
“Crystal structure of the obese protein leptin-E100”
Nature (1997) **387**, 206-9